

Regulation des POU Faktors Brn-3a und Analyse seiner Effektorgene

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Bio- und Geowissenschaften
der Universität Essen
vorgelegt von

Beate Katharina Fraß

aus Marburg

Juli 2001

Die Experimente der vorliegenden Arbeit wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. T. Möröy am Institut für Zellbiologie (Tumorforschung) der Universität Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. T. Möröy

2. Gutachter: Prof. Dr. Dr. Ch. Redies

Vorsitzender des
Prüfungsausschusses: Prof. Dr. R. Hensel

Tag der mündlichen Prüfung: 21. November 2001

1.	EINLEITUNG	1
2.	ERGEBNISSE	15
2.1.	Durchmustern einer humanen genomischen Bibliothek	15
2.2.	Ermittlung der Transkriptionsstartstellen des Brn-3a Gens	17
2.2.1.	Transkriptionsstartstellen von Brn-3a(l)	19
2.2.2.	Transkriptionsstartstellen von Brn-3a(k)	24
2.2.3.	Computergestützte Analyse der Startstellen von Brn-3a	26
2.3.	Promotoraktivität von Brn-3a	27
2.3.1.	Promotoraktivität von Brn-3a(l)	28
2.3.2.	Promotoraktivität von Brn-3a(k)	30
2.4.	Charakterisierung von S24	36
2.4.1.	Proteinbindung an S24	36
2.4.2.	Wirkung von S24 auf heterologe Promotoren	38
2.4.3.	S24 im Kontext von Brn-3a(l) und Brn-3a(k)	42
2.5.	Effektorgene von Brn-3a	45
2.5.1.	Induzierbare Brn-3a(l) Zelllinien	45
2.5.2.	DNA-Array-Analyse	50
3.	DISKUSSION	52
3.1.	Promotoranalyse von Brn-3a(l)	52
3.1.1.	Transkriptionsstartstellen von Brn-3a(l)	52
3.1.2.	Promotoraktivität von Brn-3a(l)	55
3.2.	Promotoranalyse von Brn-3a(k)	56
3.2.1.	Transkriptionsstartstellen von Brn-3a(k)	56
3.2.2.	Promotoraktivität von Brn-3a(k)	57
3.2.3.	Differentielle Aktivität beider Brn-3a Promotoren	61
3.3.	Überexpression von Brn-3a	62
3.3.1.	Brn-3a Überexpression in induzierbaren NIH3T3 Zelllinien	62
3.3.2.	DNA-Array-Expressionsanalyse	63

3.4.	Weiterführende Arbeiten	64
4.	MATERIAL & METHODEN	66
4.1.	Chemikalien und Enzyme	66
4.2.	DNA Sonden	66
4.3.	Oligodesoxynukleotide	66
4.4.	Vektoren	67
4.5.	Häufig verwendete Lösungen	67
4.6.	Gelelektrophorese und Transfer auf Nylonmembranen	68
4.6.1.	Agarose-Gelelektrophorese	68
4.6.2.	Transfer von DNA auf Nylonmembranen (Southern Blot)	69
4.6.3.	Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese	69
4.6.4.	Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese	70
4.6.5.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	70
4.6.6.	Proteintransfer und -nachweis	72
4.7.	Phagen	73
4.7.1.	Präparation von Wirtsbakterien	73
4.7.2.	Bestimmung des Phagentiters und Ausplattieren	74
4.7.3.	Durchmustern einer genomischen DNA-Bibliothek	74
4.8.	Bakterien	75
4.8.1.	Herstellung kompetenter Bakterien	75
4.8.2.	Transformation kompetenter Bakterien	76
4.9.	DNA	76
4.9.1.	Isolierung von Plasmid-DNA aus 3 ml Kulturen	76
4.9.2.	Isolierung von Plasmid-DNA im präparativen Maßstab	77
4.9.3.	Isolierung von genomischer DNA	77
4.9.4.	Isolierung von Phagen-DNA	78
4.9.5.	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren in Lösung	78
4.9.6.	Restriktionsendonukleaseverdau	79
4.9.7.	Konversion überhängender DNA-Enden	79
4.9.8.	Dephosphorylierung von 5' Enden der DNA	79

4.9.9.	Aufreinigung von DNA-Fragmenten	80
4.9.10.	Kinasierung von Oligodesoxynukleotiden	80
4.9.11.	Ligation	80
4.9.12.	Polymerasekettenreaktion (PCR)	80
4.9.13.	Herstellung radioaktiv markierter Sonden	81
4.9.14.	Radioaktive Markierung von Oligodesoxynukleotiden	81
4.9.15.	Gelretardierungsanalyse	82
4.10.	RNA	83
4.10.1.	Isolierung von RNA	83
4.10.2.	Primer Extension	83
4.10.3.	Reverse Transkription	84
4.10.4.	Verankerte Polymerasekettenreaktion (RACE-PCR)	85
4.11.	Proteine	85
4.11.1.	Proteinbestimmung	85
4.11.2.	Präparation von Gesamtzellproteinextrakten	86
4.11.3.	Präparation von Kernextrakten	86
4.12.	Zellkultur	87
4.12.1.	Zelllinien	87
4.12.2.	Medien und Lösungen	88
4.12.3.	Beschichtung von Gewebekulturplatten	88
4.12.4.	Kultivierung	88
4.12.5.	Passagieren von Zellen	89
4.12.6.	Einfrieren und Auftauen von Zellen	89
4.12.7.	Elektroporation von Zellen	89
4.12.8.	Messung von Reportergenaktivitäten (Luziferase)	90
5.	ZUSAMMENFASSUNG	92
6.	LITERATURVERZEICHNIS	93

Abkürzungen

A	Adenin
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
C	Cytidin
cDNA	Kopie-DNA (copy-DNA)
Ci	Curie
cpm	Ereignisse pro Minute (counts per minute)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	"Dulbecco's modified eagles medium"
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Fa.	Firma
FBS	fötales Kälberserum
G	Guanidin
GTF	genereller Transkriptionsfaktor
mRNA	Boten-RNA (messenger-RNA)
μF	Mikro-Farat
OD	optische Dichte
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion (polymerase chain reaction)
PIC	Präinitiationskomplex
RNA	Ribonukleinsäure

SDS	Natriumdodecylsulfat (sodiumdodecylsulfate)
SSC	Citrat gepufferte Kochsalzlösung
STE	Tris-gepufferte Kochsalz-EDTA-Lösung
T	Thymidin
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
tTA	tetracyclinabhängiger Transaktivator
TRE	Tet Responsive Element
Tween	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
UpM	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Gewicht/Volumen (weight/volume)
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. Einleitung

Der komplexe Organismus des Menschen besteht aus mehr als 10 Billionen Zellen, die in etwa 200 Zelltypen und unzählige davon ableitbare Subtypen unterteilt werden. Nur durch optimale Koordination dieser Zellvielfalt kann ein funktionsfähiger Organismus entstehen. Einer der wichtigsten Zelltypen sind die neuronalen Zellen (Neuronen); sie entstehen während der Embryonalentwicklung und stellen neben den Immunzellen die Zellpopulation mit der größten Variabilität und Komplexität dar. Die etwa 25.000 bis 35.000 Gene (Ewing und Green, 2000; Roest Crolius, *et al.*, 2000), die einem Menschen zur Verfügung stehen, reichen bei weitem nicht aus, um alle neuronalen Verbindungen (wahrscheinlich 10^{15} !) direkt zu spezifizieren. Statt dessen aktivieren epigenetische Ereignisse - sowohl embryonalen als auch umweltbedingten Ursprungs - verschiedene Gene zu unterschiedlichen Zeiten der Entwicklung des Menschen.

Um das komplexe neuronale System während der Embryogenese korrekt entwickeln zu können, müssen die beteiligten Proteine zur richtigen Zeit am richtigen Ort und in der richtigen Konzentration vorliegen. Das Fehlen eines einzelnen Gens kann ausreichen, um eine Vielzahl von Neuronen gar nicht erst entstehen zu lassen. Fehlt Mäusen beispielsweise das Pax-2 Gen, können Teile des Mittelhirns und das Kleinhirn während der Embryonalentwicklung nicht gebildet werden (Bouchard, *et al.*, 2000).

Auf dem Weg von der DNA über die Boten-RNA (mRNA) bis hin zum fertigen Protein gibt es vielfältige Möglichkeiten zur Regulation der Proteinexpression. Die Menge eines Proteins in der Zelle ist abhängig von seiner Stabilität, von der Stabilität seiner mRNA, und nicht zuletzt von der Häufigkeit, mit der das Gen abgelesen wird, also von der Transkriptionsrate. In den letzten Jahren wurde gezeigt, daß die Regulation auf der Ebene der Transkription sehr häufig entscheidend für die Menge eines Proteins in der Zelle ist (Maldonado und Reinberg, 1995).

Als Transkription wird der Prozeß bezeichnet, bei dem eine DNA-abhängige RNA-Polymerase an die DNA bindet und aus Ribonukleotidtriphosphaten ein zur DNA

komplementäres RNA-Molekül synthetisiert. Nach Prozessierung entsteht daraus die mRNA, die in das Zytoplasma transloziert und dort als Vorlage für die Proteinsynthese fungiert. Die DNA-abhängige RNA-Polymerase, welche in Eukaryoten zuständig für die Synthese der späteren mRNA ist, wird RNA-Polymerase II (Pol II) genannt. Sie besteht aus 12 Untereinheiten und benötigt eine Vielzahl von anderen Proteinen zur Durchführung der beiden wesentlichen Schritte des Transkriptionsstarts, der Initiation der Transkription und der Aktivierung der Transkription. Regulatorische DNA-Elemente für diese Schritte befinden sich direkt oberhalb des Gens und werden als 'proximaler Promotor' bezeichnet. Weitere DNA-Sequenzen, die Einfluß auf die Transkriptionsrate nehmen können, liegen weiter stromaufwärts (5'), stromabwärts (3') oder innerhalb des Gens und wirken richtungsunabhängig. Diese distalen Promotorregionen werden als Enhancer- oder Silencer-Elemente bezeichnet (Mitchell und Tjian, 1989).

Innerhalb der proximalen Promotorregion ist der Basalpromotor diejenige Sequenz, die für die Transkription ohne Aktivatoren, also die basale Transkription, notwendig ist. Die Faktoren, welche neben der RNA-Polymerase II dafür zuständig sind, werden als 'generelle Transkriptionsfaktoren' (GTFs) bezeichnet und bilden zusammen mit der Pol II die 'basale Transkriptionsmaschinerie' (Beyersmann, 2000; Hampsey, 1998; Maldonado und Reinberg, 1995). Die generellen Transkriptionsfaktoren sind Proteinkomplexe, die systematisch in der Reihenfolge ihrer Entdeckung als TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE und TFIIH benannt wurden. So ist das Protein TBP (TATA binding protein) beispielsweise eine Untereinheit des Transkriptionsfaktors TFIID. Nur wenn die Polymerase und alle generellen Transkriptionsfaktoren (mit einer möglichen Ausnahme von TFIIA) auf der DNA zusammengesetzt sind, kann die Transkription starten. Zusätzlich zu den TFII Faktoren gibt es die sogenannten TAFs ('TBP associated factors'), die sowohl in die Promotorerkennung als auch in die Übermittlung von Signalen spezieller Aktivatoren involviert sind. Für den Verlauf des Zusammenbaus des Präinitiationskomplexes (PIC) mit seinen mehr als 50 Einzelkomponenten werden zwei Modelle diskutiert. Das Mehrschritt-Modell, nach dem sich der Präinitiationskomplex in einer geordneten, schrittweisen Art bildet (Orphanides, *et al.*, 1996) und das Holoenzym-

Model, nach dem sich der PIC *in vivo* in einem einzigen Schritt bildet (Greenblatt, 1997). In Abb. 1.1 ist ein vereinfachter Aufbau der basalen Transkriptionsmaschinerie dargestellt.

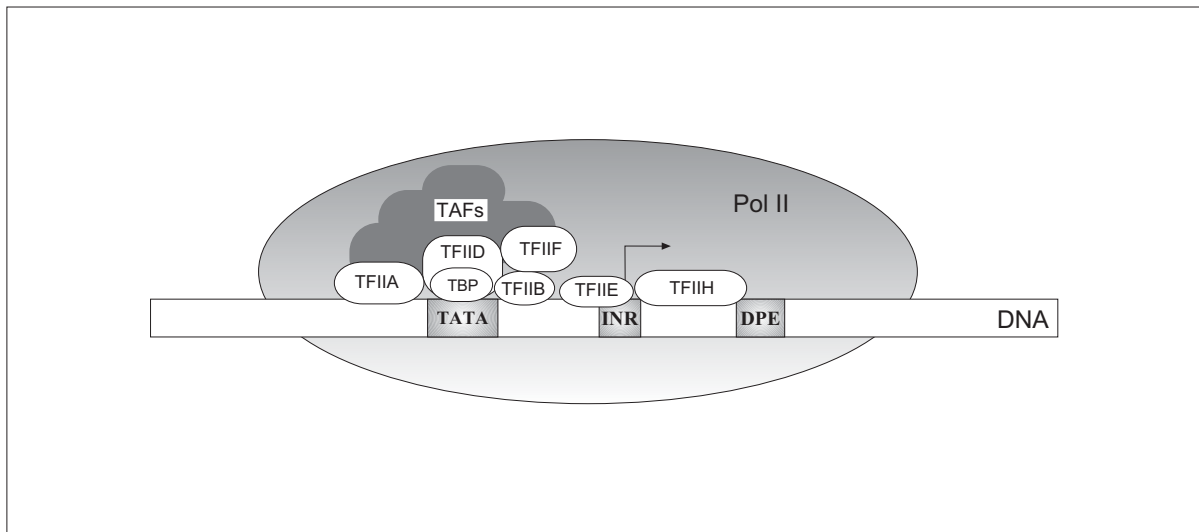


Abb.1.1 Core-Promotor mit RNA-Polymerase II und generellen Transkriptionsfaktoren

Schematisch gezeigt ist die DNA mit einer TATA-Box, einem INR Element (initiator region) und einem DPE (downstream promoter element). Das DPE ist in einigen TATA-losen Promotoren, die INR Elemente beinhalten, vorhanden. Außerdem sind die Komponenten der basalen Transkriptionsmaschinerie abgebildet. Die generellen Transkriptionsfaktoren sind Proteinkomplexe und werden mit TFIIA bis TFIIH bezeichnet. TBP (TATA binding protein) ist eine Komponente des TFIID Komplexes. Weitere an der generellen Transkription beteiligte Faktoren sind die TAFs (TBP associated factors), die jedoch nicht essentiell für die basale Transkription sind.

Basalpromotoren zeichnen sich durch Übereinstimmung bestimmter DNA-Sequenzen aus, die auch zur Vorhersage von Promotorregionen herangezogen werden können. Diese DNA-Elemente werden von Teilen der Transkriptionsmaschinerie benötigt, um diese auf der DNA zu positionieren. Das wichtigste DNA-Element in Basalpromotoren ist die TATA-Box (Konsensussequenz: TATAAAA) (Lee und Young, 1998), sie liegt in Eukaryonten etwa 25-30 nt 5' der Startstelle. Dieses DNA-Modul ist so entscheidend für Positionierung der basalen Transkriptionsmaschinerie auf der DNA, daß Promotoren in TATA und TATA-lose Promotoren eingeteilt werden. Neben diesem DNA-Element gibt es weitere, die entweder gemeinsam mit der TATA-Box oder ohne diese in Basalpromotoren vorkommen können. Das INR Element (initiator region, Konsensussequenz: (Py) Py A+1 N T/A Py (Py)) (Smale, 1997) bindet direkt an der Transkriptionsstartstelle und kann sowohl mit der TATA-Box als auch ohne diese auftreten. Ein weiteres Basalpromotor-DNA-Element ist das DPE (downstream promoter element, Konsensussequenz: A/G G A A/T C G T G). Es ist etwa 30-50 nt

stromabwärts des Starts der RNA lokalisiert und tritt ausschließlich in Verbindung mit dem INR Element auf. Es gibt auch Promotoren, die keines der Basalpromotor-Module aufweisen; solche Null-Promotoren haben keine definierte RNA Startstelle. In Abb. 1.2 sind die verschiedenen Möglichkeiten des Aufbaus der Basalpromotoren dargestellt.

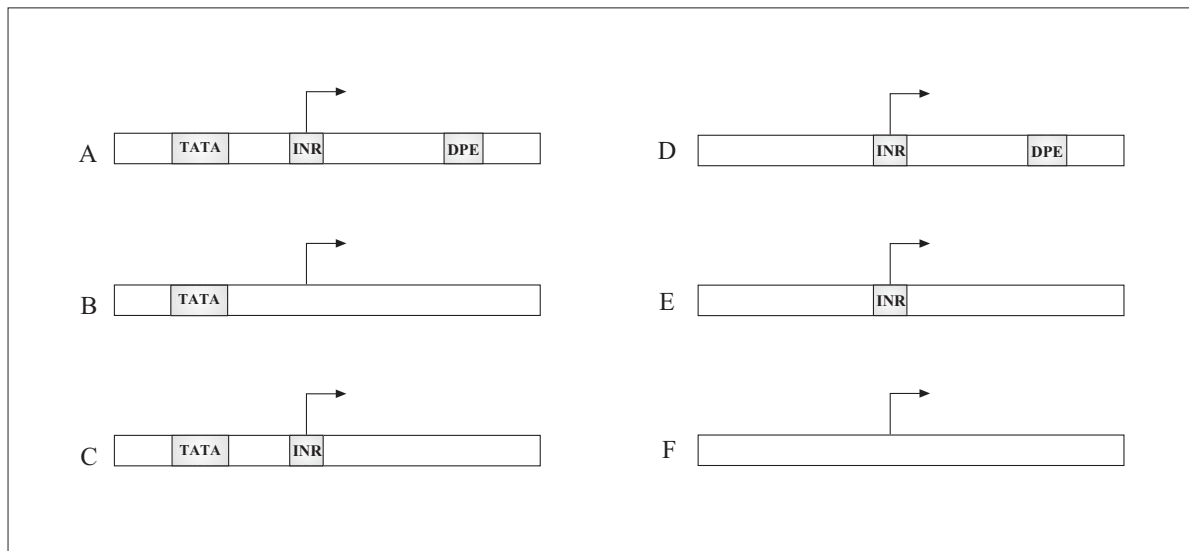


Abb. 1.2. Möglichkeiten des Aufbaus der Basalpromotoren

Dargestellt sind Module des Basalpromotors, die in den gezeigten Kombinationen vorkommen können. Promotoren der Zusammensetzung A-E zeichnen sich durch definierte Startstellen aus. Promotoren, die keines der Basalpromotormodule enthalten, werden als Null-Promotoren bezeichnet. Sie besitzen häufig mehrere, nicht klar definierte Startstellen der Transkription.

Neben der basalen Transkriptionsmaschinerie mit den generellen Transkriptionsfaktoren gibt es solche, die auf den distalen bzw. proximalen Promotor einwirken und durch direkte oder indirekte Interaktion mit der basalen Transkriptionsmaschinerie die Transkription modulieren (Transaktivierung bzw. Transrepression) (Roberts, 2000). Neuere Untersuchungen zeigen, daß die indirekte Interaktion nicht nur durch einzelne Kofaktoren, sondern durch einen Proteinkomplex, genannt Mediatorkomplex, bewerkstelligt werden kann (Rachez und Freedman, 2001).

Die Aktivierung bzw. Repression erfolgt synergistisch durch mehrere modulierende Transkriptionsfaktoren (Herbomel, 1990) und kann auf mehreren Ebenen erfolgen.

Aktivatoren können wirken durch Derepression der Transkription infolge der Aufhebung transkriptionell inhibitorischer Zustände (z.B. Nukleosomen-Destabilisierung durch Acetylierung), durch Rekrutierung der basalen Transkriptionsmaschinerie, durch Stimulierung der

PIC-Bildung, durch Stimulation der Reinitiation (durch Stabilisierung der GTFs nach Promotor-'Clearance'), durch Stimulation der Elongation (z.B. durch Rekrutierung von Elongationsfaktoren) und durch Veränderung der Promotor-Topologie (z.B. durch Verbiegung der DNA).

Repressoren interagieren ähnlich wie Aktivatoren direkt oder über Korepressoren mit den gleichen Zielmolekülen der Aktivatoren (PIC, Elongationsfaktoren etc.). Zusätzlich können einige Repressoren durch Konkurrenz mit Aktivatoren um deren Bindungsstellen auf der DNA konkurrieren oder durch Dimerisierung mit Aktivatoren inaktive Heterodimere bilden. Ein weiteres Ziel für repressorisch wirkende Moleküle ist die Chromatin-Umorganisation.

Die bisher beschriebene Aktivierung bzw. Repression der Transkription ist bei weitem nicht ausreichend, um die etwa 30.000 Gene eines Menschen so zu regulieren, wie es zur Entstehung und Erhaltung eines komplexen Organismus nötig ist. Eine wichtige Rolle spielt hierbei die Regulation der Transkription durch Enhancer-Elemente. Sie binden in den distalen Promotorregionen und können, wie bereits beschrieben, 5' oder 3' des proximalen Promotors liegen. Es gibt zwei wichtige Gruppen von Enhancern: Aktivatoren/Repressoren und DNA-biegende, architekturelle Transkriptionsfaktoren. Beide Arten bilden gemeinsam einen Komplex ('Enhanceosom'), der mit der basalen Transkriptionsmaschinerie bzw. mit Mediatoren interagiert und so die Transkription moduliert. Das Enhanceosom wird in kooperativer Weise aus den Einzelkomponenten gebildet. Für die Stabilität des Enhanceosoms ist die richtige Position der DNA-Bindungsstellen der Faktoren von enormer Bedeutung. Es konnte gezeigt werden, daß die Insertion von Oligodesoxynukleotiden in eine Enhancer-DNA-Region und die dadurch hervorgerufene Phasenverschiebung der DNA mit einer Instabilisierung des Enhanceosoms einhergeht. Die kooperative Bildung und die Stabilität des Enhancers bewirken eine Spezifität und Synergie in der Transkriptionsaktivierung, die über die bloße Addition beider Einzeleffekte hinausgeht (Kim und Maniatis, 1997). In Abb. 1.3 ist ein Modell eines Enhancersoms dargestellt.

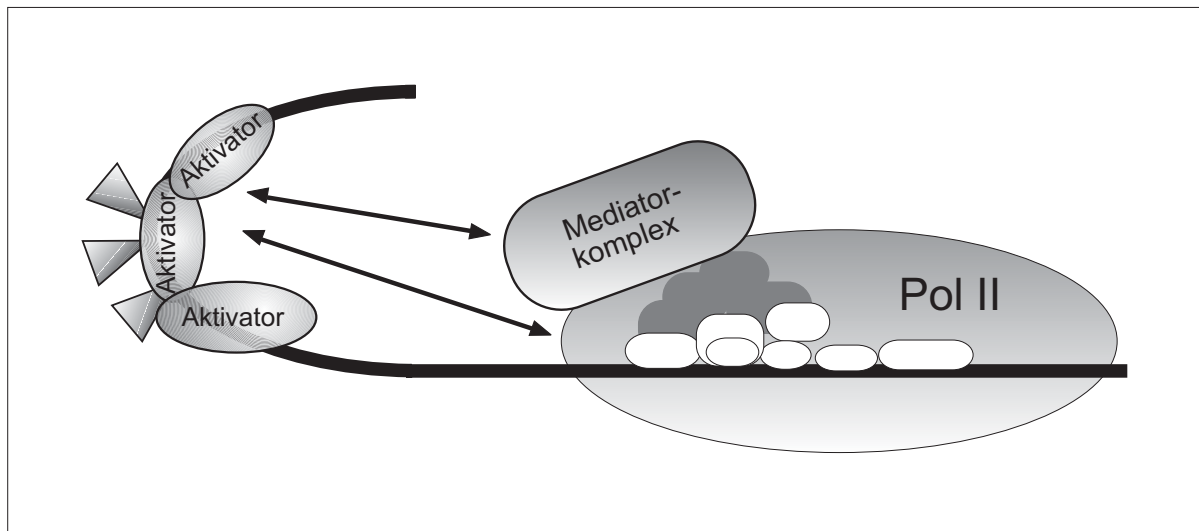


Abb. 1.3 Wechselwirkung zwischen dem Enhanceosom und der basalen Transkriptionsmaschinerie

Die DNA-biegenden Faktoren (dargestellt als Dreiecke) und die sequenzspezifischen Aktivatoren, die am distalen Promotor binden, bilden das Enhanceosom. Wechselwirkungen des Enhanceosoms mit Faktoren der basalen Transkriptionsmaschinerie führt zur kooperativen Rekrutierung der Pol II und den assoziierten Faktoren an die DNA.

Die Wirkungsweise des Enhanceosoms führt zu einer enormen Spezifizierung der Transkription. Eine weitere Möglichkeit, die nötige Spezifität der Transkription zu erreichen, ist die gewebespezifische Expression der Transkriptionsfaktoren. Neben ubiquitären Transkriptionsfaktoren, die überall und zu fast jeder Zeit während der Embryonalentwicklung und später in allen Gewebetypen zu finden sind, wie SP1, Myc, Fos, Jun und Oct-1, gibt es gewebespezifische Transkriptionsfaktoren, deren Expression auf verschiedene Entwicklungsstadien und bestimmte Gewebe limitiert ist. Gewebespezifische Transkriptionsfaktoren binden wie ubiquitär exprimierte Transkriptionsfaktoren an konservierte DNA-Sequenzen. Von diesen DNA-Motiven gibt es nur eine limitierte Anzahl, dies hat zur Folge, daß mehrere Transkriptionsfaktoren die gleiche Erkennungssequenz haben können. Als Beispiel seien hier die Proteine Brn-3a und Oct-1 genannt. Dadurch bedingt zeichnen sich Transkriptionsfaktoren mit der gleichen DNA-Erkennungssequenz oft durch eine sehr ähnliche dreidimensionale Struktur ihrer DNA-Bindungsdomäne aus, welches Ähnlichkeiten in der Aminosäuresequenz der Transkriptionsfaktoren voraussetzt. Anhand dieser Homologie lassen sich Transkriptionsfaktoren in mehr als 30 Familien zusammenfassen (Ryan und Rosenfeld, 1997).

Häufig binden Transkriptionsfaktoren auch als Dimere an DNA-Motive, wodurch die Vielfalt der Regulation der Transkription deutlich vergrößert wird. Ein Beispiel hierfür ist die

Interaktion von Myc und Max (Blackwood und Eisenman, 1991; Blackwood, *et al.*, 1991). Myc und Max bilden Heterodimere und sind so in der Lage, Zielgene von Myc zu aktivieren. Ist die Konzentration des Myc-Proteins jedoch gering, werden vermehrt Max/Max Homodimere gebildet. Diese binden zwar an die gleiche DNA-Sequenz (E-Box), reprimieren jedoch die Transkription der Myc-Zielgene. Max kann außerdem Heterodimere mit Mad-1 (Ayer, *et al.*, 1993) und Mxi-1 bilden, wodurch die Komplexität der Regulation noch erhöht wird (Amati und Land, 1994). Gewebespezifität wird hier durch die Bildung verschiedener Heterodimere mit gewebespezifisch exprimierten Transkriptionsfaktoren erreicht. Basische Helix-Loop-Helix (bHLH) Faktoren, zu denen die E-Box-bindenden Proteine gehören, spielen eine wichtige Rolle in der spezifischen neuronalen Genexpression (Guillemot, 1999). Ubiquitär exprimierte Mitglieder dieser Familie dimerisieren mit spezifischen neuronalen Proteinen wie MASH (wird durch NGF reguliert) und NSCL, um so bei der gewebespezifischen Expression von Genen mitzuwirken (Itoh, *et al.*, 1997).

Eine weitere Klasse von gewebespezifischen Transkriptionsfaktoren, deren Aktivität durch Bildung von heterodimeren Komplexen moduliert wird, sind die POU-Faktoren (Phillips und Luisi, 2000; Ruvkun und Finney, 1991; Ryan und Rosenfeld, 1997; Vrijzener und Van der Vliet, 1993; Wegner, *et al.*, 1993). Die POU-Domäne besteht aus zwei Subdomänen, die an DNA in kooperativer Weise binden. Getrennt werden diese Subdomänen durch einen hypervariablen Linker (Sturm und Herr, 1988). Die N-terminale Subdomäne wird als POU-spezifische Domäne (POU_S), die C-terminale als POU-Homöodomäne (POU_H) bezeichnet.

Die Mitglieder dieser Transkriptionsfaktorfamilie werden räumlich und zeitlich reguliert während der Embryonalentwicklung exprimiert und treten in speziellen neuronalen Zellpopulationen auf (McEvelly und Rosenfeld, 1999; Schonemann, *et al.*, 1998; Scotting und Rex, 1996; Treacy und Rosenfeld, 1992). Sie können sowohl als aktivierende als auch als reprimierende Regulatoren wirken. Ob ein Regulator als Aktivator oder Repressor fungiert, hängt von dem zu regulierenden Promotor und oft auch von der Lokalisierung der DNA-Bindungsstelle innerhalb eines Promotors sowie von Kofaktoren ab. Ein gutes Beispiel für die Regulation der Transkription durch Heterodimerisierung ist das Protein I-POU (inhibitor of

POU) (Treacy, *et al.*, 1991). Dieses neuronal exprimierte Protein reprimiert die Transkription der Dopa-Decarboxylase in *Drosophila*, indem es mit einem anderen POU-Faktor, Cfl-a, dimerisiert. Cfl-a ist wie I-POU ein Transaktivator. Da das I-POU/Cfl-a Dimer ebenso wie I-POU alleine nicht in der Lage ist, DNA zu binden, fungiert I-POU als negativer Modulator der Cfl-a Aktivität (Treacy, *et al.*, 1991).

In den genannten Beispielen der Transkriptionsfaktorheterodimere Myc/Max und I-Pou/Cfl-a ist die Zusammensetzung des Dimers entscheidend für die Art der Modulation der Transkription durch die Transkriptionsfaktoren. Es gibt aber auch Beispiele für unterschiedliche DNA-Motive, an die gleiche Transkriptionsfaktordimere in unterschiedlichen Konformationen binden, und abhängig davon mit Aktivatoren interagieren können. So konnte beispielsweise gezeigt werden, daß die Aktivierung durch den Koaktivator OBF-1 abhängig von der Konformation der zweiteiligen POU-Domäne des POU-Faktors Oct-1 ist (Abb. 1.4). Diese wiederum ist abhängig von der DNA-Sequenz, an die Oct-1 bindet. Bei Bindung von Oct-1 an die PORE-Sequenz (ATTTGAAATGCAAAT) ist eine Aktivierung durch OBF-1 möglich, nicht jedoch, wenn Oct-1 an die MORE-Sequenz (ATGCATATGCAT) bindet (Tomilin, *et al.*, 2000).

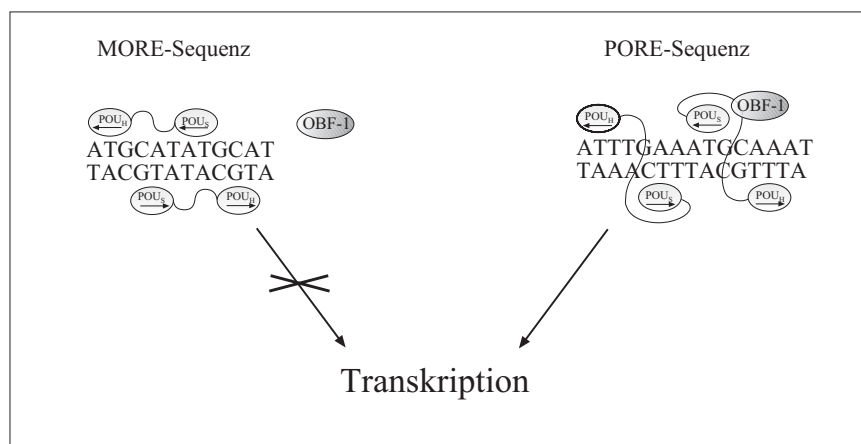


Abb. 1.4 Bindung der POU-Domäne an unterschiedliche DNA-Sequenzen

POU-Faktoren besitzen eine zweigeteilte DNA-Bindungsdomäne. Je nach DNA-Sequenz können sie in unterschiedlichen Konformationen an diese DNA-Motive binden. Dies führt dazu, daß unterschiedliche Bereiche des POU-Faktors zugänglich für Interaktionen mit anderen Proteinen sind.

Hier bindet der POU Faktor Oct-1 in unterschiedlichen Konformationen an die Sequenzen PORE und MORE. Im Falle der Bindung von Oct-1 an PORE kann der Transaktivator OBF-1 mit Oct-1 interagieren, die Transkription der Zielgene wird aktiviert. Die Konformation des MORE/Oct-1 Komplexes verhindert eine Bindung von OBF-1 an Oct-1 und damit die Transkription von Oct-1 Zielgenen.

Nachdem eine Reihe von Transkriptionsfaktoren identifiziert und ihre Strukturen bekannt waren, kristallisierte sich durch Austauschexperimente von Sequenzen ein Bild vom Aufbau

dieser Moleküle heraus (Tjian und Maniatis, 1994). Danach sind Transkriptionsfaktoren modular aufgebaut. Es gibt verschiedene voneinander unabhängige Bausteine, sogenannte Proteindomänen (Beato, 1989), einige sind absolut notwendig, das Vorhandensein anderer ist optional. So ist es unabdingbar für die Funktion eines Transkriptionsfaktors, daß er eine transaktivierende bzw. eine transreprimierende Domäne besitzt, die mit dem Transkriptionsapparat interagiert (Triezenberg, 1995). Außerdem ist die schon erwähnte DNA-bindende Domäne nötig (Nelson, 1995). Zusätzlich zu den genannten Domänen kann ein Transkriptionsfaktor eine Dimerisierungsdomäne zur Interaktion mit anderen Faktoren und weitere regulatorische Domänen besitzen.

Sequenzähnlichkeiten der Transkriptionsfaktoren **Pit-1**, **Oct-1/2**, und **Unc-86** führten zur Identifizierung einer neuen DNA-Bindungsdomäne, der POU-Domäne (Herr und Cleary, 1995; Ryan und Rosenfeld, 1997; Verrijzer und Van der Vliet, 1993). Die POU-Domäne besteht aus zwei Subdomänen, die an DNA in kooperativer Weise binden. Verbunden werden diese Subdomänen durch einen hypervariablen Linker (Sturm und Herr, 1988). Die N-terminale Subdomäne, die POU-spezifische Domäne (POU_s), besteht aus ca. 75 Aminosäuren, die C-terminale POU-Homöodomäne (POU_H) aus etwa 60 Aminosäuren. Der Linker kann aus 15 bis 56 Aminosäuren bestehen. Die Homöodomäne ist als DNA-bindendes Motiv, auch ohne die POU spezifische Domäne, anzutreffen, nicht so die POU spezifische Domäne. Sie ist nur in POU-Faktoren zu finden und hat ohne die POU_H-Domäne nur eine geringe Bindungsaffinität zur DNA.

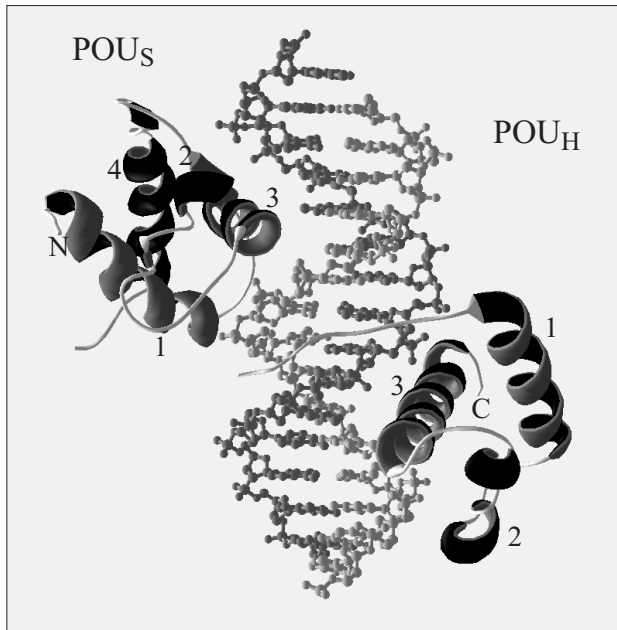


Abb. 1.5 POU-Domäne

Die Helix 3 der POU-Homöodomäne (POU_H) und die Helix 3 der POU spezifischen Domäne (POU_S) liegen in der großen Furche der DNA und erkennen spezifisch DNA-Sequenzen. Verbunden werden die beiden Subdomänen durch einen variablen Linker. Die POU spezifische Domäne tritt im Gegensatz zur POU-Homöodomäne nie alleine auf und hat ohne die POU-Homöodomäne nur eine sehr schwache DNA-Bindungsaffinität.

Die DNA-Bindungsdomäne des POU-Faktors Oct-1 wurde gemeinsam mit DNA kristallisiert (Klemm, *et al.*, 1994). Die Strukturdaten zeigen, daß jede der beiden Subdomänen ein Helix-Turn-Helix-Motiv ausbildet. Die POU_S-Domäne besteht aus vier, die POU_H-Domäne aus drei α -Helices. Jeweils Helix III geht spezifische Kontakte mit der großen Furche der DNA ein. Beide Subdomänen erkennen gemeinsam Oktamermotive (ATGCAAAT) oder Varianten dieser Sequenz (Wegner, *et al.*, 1993). Der Linker ist aufgrund seiner räumlichen Variabilität nicht auf Elektronendichtekarten zu erkennen. Seine Länge hat Einfluß auf die DNA Erkennung der POU-Domäne (Aurora und Herr, 1992). Neben der DNA-Bindung bietet die POU-Domäne eine Oberfläche zur Interaktion mit anderen Proteinen (Verrijzer, *et al.*, 1992; Voss, *et al.*, 1991).

Durch Sequenzvergleich der POU-Faktoren wurde neben der POU-Domäne eine weitere konservierte Region im N-terminalen Bereich dieser Proteinfamilie, die POU-Box, gefunden. Aufgrund der Sequenzähnlichkeiten in diesem Bereich werden die POU-Faktoren in sechs Untergruppen eingeteilt. Die Sequenzen, die POU-Faktoren für die jeweilige Untergruppe determinieren, heißt POU-Box und befindet sich im N-Terminalen Bereich der POU-Proteine. In Tabelle 1.1 sind die einzelnen Untergruppen dieser Transkriptionsfaktorfamilie und dazugehörige Proteine dargestellt.

Klasse	Name	Expression	
		embryonal	adult
I	Pit-1	Neuralrohr, Hypophyse	Hypophyse
II	Oct-1	ubiquitär	ubiquitär
	Oct-2	Neuralrohr, Gehirn mit Ausnahme von Telencephalon	Lymphozyten, Nervensystem, innere Organe
III	Brn-1	sich entwickelndes Nervensystem	ZNS, Niere
	Brn-2	sich entwickelndes Nervensystem	ZNS, Glio- und Neuroblastoma
	Brn-4	sich entwickelndes Nervensystem	ZNS, Pankreas
IV	Brn-3a	sich entwickelndes Nervensystem,	Nervensystem, Retina, sensorische Ganglien, Milz
	(Unc-86)	Rückenmark, Hirnstamm, Retina	
	Brn-3b	sich entwickelndes Nervensystem	
	Brn-3c	sich entwickelndes Nervensystem	
V	Oct-3/4	Testis, Ovar, Embryonale Stammzellen	Oozyten
VI	Emb	sich entwickelndes Nervensystem	Gehirn, Niere, Muskel, Testis
	Brn-5		ZNS

Tab. 1.1 Übersicht zur Familie der POU-Transkriptionsfaktoren

Neben dem bereits erwähnten Brn-3a gibt es noch weitere POU-IV-Faktoren, die zur Brn-3 Familie gehören, Brn-3b und Brn-3c. Alle drei werden von unterschiedlichen Genen kodiert. Als erstes Mitglied der Brn-3 Familie wurde Brn-3a durch PCR mit degenerierten Oligonukleotiden, die für konservierte Bereiche in der POU-Domäne spezifisch sind, aus RNA von Rattengehirn isoliert (He, *et al.*, 1989). Später wurde das humane Brn-3a beim Durchmustern einer humanen Plazenta Genbank unter niedrig stringenten Bedingungen mit einer N-Myc-Sonde gefunden (Collum, *et al.*, 1992). Als danach eine kurze Form von Brn-3a isoliert wurde, der das erste Exon fehlt (Theil, *et al.*, 1993), wurde die zuerst entdeckte Form Brn-3a(l) genannt, die kurze Brn-3a(k). Auch von Brn-3b war zunächst nur die lange Form bekannt (Xiang, *et al.*, 1993). Als die kurze Form isoliert wurde (Theil, *et al.*, 1993), wurden

die beiden Proteine analog zu Brn-3a mit (l) und (k) bezeichnet. Von Brn-3c ist bisher nur eine Form bekannt. Die Struktur des genomischen Locus läßt jedoch die Möglichkeit zu, daß es auch von Brn-3c zwei Formen gibt (Ninkina, *et al.*, 1993; Theil, *et al.*, 1993).

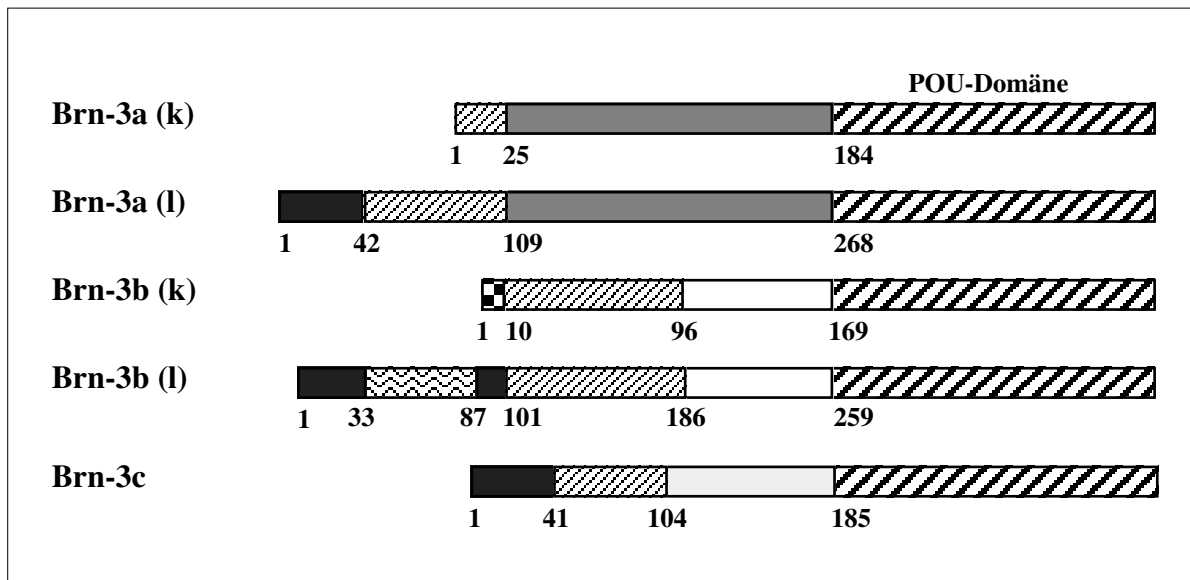


Abb. 1.5 Schematischer Aufbau der Brn-3-Proteine

Regionen mit hoher Sequenzähnlichkeit sind durch gleiche Färbung und Schraffur gekennzeichnet. Brn-3a(k) fehlt das Exon 1 von Brn-3a(l), die Translation von Brn-3a(k) startet im Exon 2 von Brn-3a(l). Die Brn-3b Proteine haben unterschiedliche N-terminale Bereiche, beiden Formen von Brn-3b müssen also durch alternatives Spleißen entstehen. Von Brn-3c ist bisher nur eine Form bekannt.

Brn-3a wird während der Emryonalentwicklung differentiell exprimiert. Transkripte sind ab dem embryonalen Entwicklungstag 11 (E11) nachweisbar, später auch in der adulten Maus. Die Expression von Brn-3b und Brn-3c ist zeitlich limitierter, sie werden später als Brn-3a exprimiert. Zur Expression von Brn-3b in der adulten Maus gibt es verschiedene Ergebnisse: mit einer Brn-3 Sonde konnten Transkripte für Brn-3a und Brn-3b im adulten Tier nachgewiesen werden, nicht jedoch mit einer Sonde, die spezifisch Brn-3b(k) nachweisen kann. Ebenso wenig ist Brn-3c im adulten Tier nachweisbar. Brn-3a ist stark in den Hinterwurzelganglien des Rückenmarks, im Trigeminalganglion und in Teilen des Vorder- und Hinterhirns exprimiert. Brn-3b wird stark in der sich entwickelnden Retina, Brn-3c nur schwach in sensorischen Ganglien und im Rückenmark exprimiert.

Interessanterweise hat Brn-3a onkogene Eigenschaften, wie in einem *in vitro* Transformationstest ermittelt werden konnte (Theil, *et al.*, 1993). Dieser Test zeigte

zusätzlich zu der onkogenen Aktivität von Brn-3a(l), daß der N-Terminus von Brn-3a(l) unverzichtbar für die Transformation der Fibroblasten ist. Brn-3a(k) und Brn-3b(k) zeigen keine Fähigkeit zur Transformation embryonaler Rattenfibroblasten. Sowohl Brn-3a(k) also auch Brn-3b(k) sind in der Lage, die transformierende Wirkung von Brn-3a(l) zu verringern, im Falle von Brn-3b(k) sogar ganz aufzuheben.

Die herausragende Eigenschaft eines Transkriptionsfaktors ist seine transaktivierende bzw. -reprimierende Wirkung. Mit Hilfe von synthetischen Promotoren konnte gezeigt werden, daß beide Brn-3a Proteine Transaktivatoren sind. Das Brn-3a(l) Protein hat zwei Domänen, die für die Transaktivierung zuständig sind, eine N-terminale, 84 Aminosäure lange Sequenz, die der kurzen Form von Brn-3a fehlt, und die POU-Domäne am C-Terminus. Einige Zielgene von Brn-3a (z.B. α -Internexin und Bcl-2) (Budhram-Mahadeo, *et al.*, 1996; Budhram-Mahadeo, *et al.*, 1995; Budhram-Mahadeo, *et al.*, 1999; Smith, *et al.*, 1998) werden nur durch die N-terminale Domäne der langen Form des Brn-3a Proteins aktiviert. Andere Zielgene wie Neurofilament, SNAP-25 und Synapsin I werden durch die POU-Domäne aktiviert. Sowohl Brn-3a(l) als auch Brn-3a(k) sind in der Lage, diese Gene zu aktivieren. Die POU-Domäne des Brn-3a Proteins unterscheidet sich von der POU-Domäne des Brn-3b durch einen Aminosäureaustausch an Position 22 in der POU-Homöodomäne. Dieser Austausch ist verantwortlich dafür, daß die Gene, die durch die C-terminale Brn-3a POU-Domäne aktiviert werden, nicht auch durch Brn-3b aktiviert werden können (Dawson, *et al.*, 1996; Dawson, *et al.*, 1998; Morris, *et al.*, 1997).

Mäuse, denen das Brn-3a Gen fehlt („knockout“ Mäuse), zeigen weitreichende Defekte in der Differenzierung und das Absterben bzw. eine fehlende Ausbildung von sensorischen und motorischen Neuronen. Der Ausfall der Funktion dieser Neuronen äußert sich vor allem in unkoordinierter Bewegung der Gliedmaßen und Beeinträchtigung des Saugreflexes, was zum Tod kurz nach der Geburt führt (McEvelly, *et al.*, 1996; Xiang, *et al.*, 1996). Im Gegensatz dazu sind die durch die Inaktivierung von Brn-3b und Brn-3c ausgelösten Effekte relativ organspezifisch. Brn-3c^{-/-} Mäuse sind taub, weil ihnen sensorische Haarzellen im Ohr fehlen

(Xiang, *et al.*, 1997; Xiang, *et al.*, 1998). Das Fehlen von Brn-3b führt zum Verlust von etwa 70 % der retinalen Ganglienzellen und hat nur geringen Einfluß auf andere Neuronen.

Eigene Fragestellung:

Das Brn-3a Protoonkogen kodiert für zwei Proteine, die gewebespezifisch während der Embryogenese exprimiert werden. Die längere Form wird als Brn-3a(l) bezeichnet, die kurze als Brn-3a(k). Die kurze Form von Brn-3a zeigt im Gegensatz zur langen Form keine transformierenden Eigenschaften und kann die transformierende Wirkung von Brn-3a(l) sogar teilweise aufheben. Da beide Proteine vom gleichen Gen kodiert werden, liegen die Promotoren von Brn-3a (l) und Brn-3a(k) in unmittelbarer Nachbarschaft auf der genomischen DNA. Es konnte gezeigt werden, daß Brn-3a(k) teilweise als Antagonist von Brn-3a(l) wirkt, daher erschien eine Analyse der beiden Promotoren und ihr Wechselspiel interessant.

Die Transkriptionsstartstellen schränken den proximalen Promotorbereich von Genen ein, deshalb sollten zunächst die Startstellen der Transkription für beide Transkripte ermittelt werden, um den Bereich für die Untersuchungen einzuschränken. Durch Reporterexperimente sollte die Promotoraktivität der einzelnen Promotoren ermittelt werden. Analysen beider Promotoren im Kontext sollten nähere Informationen über die Kontrolle der Brn-3a Transkription in Gegenwart des jeweils anderen Brn-3a Promotors geben.

Neben der transkriptionellen Regulation von Brn-3a war ein weiterer Aspekt dieser Arbeit die transkriptionelle Regulation von Brn-3a Effektorgenen. Induzierbare Zelllinien, die Brn-3a regulierbar exprimieren, sollten hergestellt und im Hinblick auf die Veränderungen der Zellen bei Brn-3a Expression untersucht werden. Mit Hilfe einer 'DNA-Array'-Analyse sollten Zielgene dieses Transkriptionsfaktors ermittelt werden.

2. Ergebnisse

Zu Beginn dieser Arbeit war nicht bekannt, wie die beiden Proteine Brn-3a(l) und Brn-3a(k) transkriptionell reguliert werden, ob es nur einen Promotor für beide Transkripte gibt oder ob jedes Transkript seinen eigenen Promotor besitzt. Da humane Tumorzelllinien zur Verfügung standen und die Regulation des humanen Gens in Hinblick auf die Tumorentstehung von Bedeutung ist, wurde der Promotor des humanen Brn-3a Gens untersucht. Zur Verfügung stand ein Konstrukt mit einer 4000 nt langen, genomischen Sequenz des humanen Brn-3a Gens, 1140 nt davon lagen vor dem Translationsinitiationskodon.

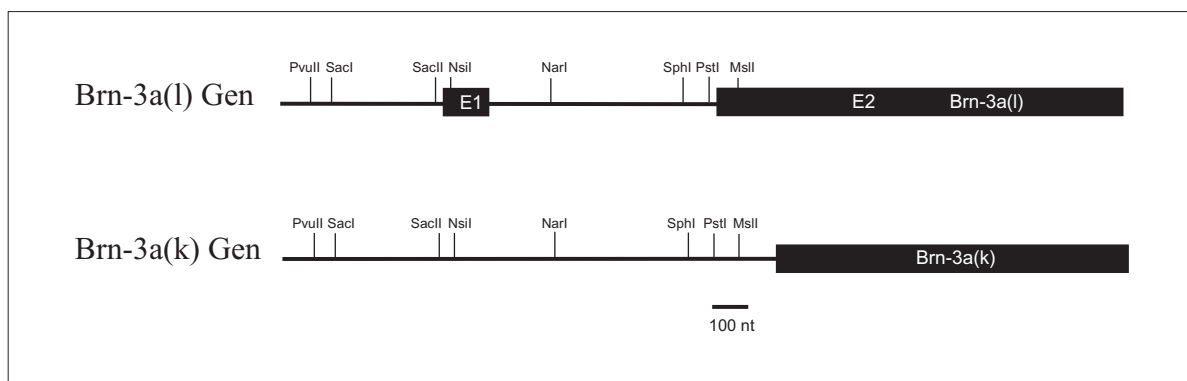


Abb. 2.1 Genomische Organisation des Brn-3a Lokus

Der Brn-3a Lokus kodiert für zwei Proteine. Brn-3a(l) wird von zwei Exons (E1 und E2) kodiert. Das Translationsinitiationskodon von Brn-3a(k) liegt in Exon 2 von Brn-3a(l). Translatierte Bereiche des Brn-3a Gens werden durch schwarze Balken dargestellt. Angegeben sind typische Restriktionsendonukleaseschnittstellen.

Der Brn-3a Lokus kodiert für zwei Proteine, Brn-3a(l) und Brn-3a(k). Im folgenden wird vom 5' Bereich des Brn-3a(l) Gens gesprochen, wenn der Bereich vor dem Translationsinitiationskodon von Brn-3a(l) gemeint ist. Der 5' Bereich des Brn-3a(k) Gens ist die Sequenz, die nach dem Translationsinitiationskodon von Brn-3a(l) beginnt und am Startkodon von Brn-3a(k) endet, sie beinhaltet Sequenzen, die im Exon 1 und Exon 2 des Brn-3a(l) Gens liegen.

2.1. Durchmustern einer humanen genomischen Bibliothek

Um weitere Information über die 5' Region des humanen Brn-3a Gens zu erhalten, wurde eine humane genomische Bibliothek durchsucht, da sich in den meisten Fällen der Bereich der Transkriptionsinitiation 500 bis 1000 nt vor dem Translationsinitiationskodon (Startkodon)

befindet und Enhancer der Transkription häufig noch weiter vom Startkodon entfernt liegen. Zunächst wurde durch PCR überprüft, ob der gesuchte 5' Bereich des humanen Brn-3a Gens überhaupt in der Bibliothek vorhanden ist.

Nachdem in der PCR mit den Oligodesoxynukleotiden H3A9 und H3APE3 (zur Lokalisierung siehe Abb. 2.2) ein Amplikon der erwarteten Größe generiert werden konnte, wurden auf 20 Platten (92 mm) Wirtsbakterien, infiziert mit je 50.000 pfu, ausplattiert. Die resultierenden Plattenlysate wurden erneut mittels PCR auf das Vorhandensein des 5' Bereichs des Brn-3a Gens untersucht. Die Phagenüberstände #2 und #8 zeigten positive Signale in der PCR. Mit diesen Lysaten wurden erneut Wirtsbakterien infiziert und mit je 40.000 pfu auf je 2 Platten (145 mm) ausplattiert. Die Filterabzüge der Platten wurden mit einer radioaktiv markierten, 900 nt überspannenden Sonde aus dem 5' untranslatierten Bereich des humanen Brn-3a(1) Gens (siehe Abb. 2.2) hybridisiert. Auf den Platten #8.1 und #8.2 des Lysats #8 konnte jeweils ein Phagenklon isoliert werden. Erneute Vereinzelung der Phagen #8.1.A und #8.2.A führte zur weiteren Anreicherung. Um ein Lysat mit nur einem Phagenklon zu erhalten, wurden in einer weiteren Runde die Phagenlysate #8.1.A.A und #8.2.A.A in einer geringen Konzentration ausplattiert. Es wurden Plaques direkt von der Platte gepickt und einer PCR Reaktion mit den oben verwendeten Primern unterworfen. Von den in der PCR positiven Phagen wurde DNA isoliert.

Durch Vergleich der DNA-Fragmentgrößen der Phagen-DNA nach Restriktionsendonukleaseverdau konnte festgestellt werden, daß es sich bei den Phagen #8.1.A.A und #8.2.A.A um gleiche Phagen handelt. Dies war zu erwarten, da beide Phagenklone aus dem gleichen Aliquot der im ersten Schritt amplifizierten Phagenbibliothek stammen. Das 9500 nt große Insert der Phagen-DNA wurde mit *EcoRI* vollständig ausgeschnitten und in den Vektor pBluescript-KS inseriert. Dieses Konstrukt wurde verwendet, um das Phageninsert zu kartieren und um kleinere Fragmente subzuklonieren. Die so generierten Konstrukte wurden teilweise sequenziert und zur Herstellung von Reportergenkonstrukten verwendet.

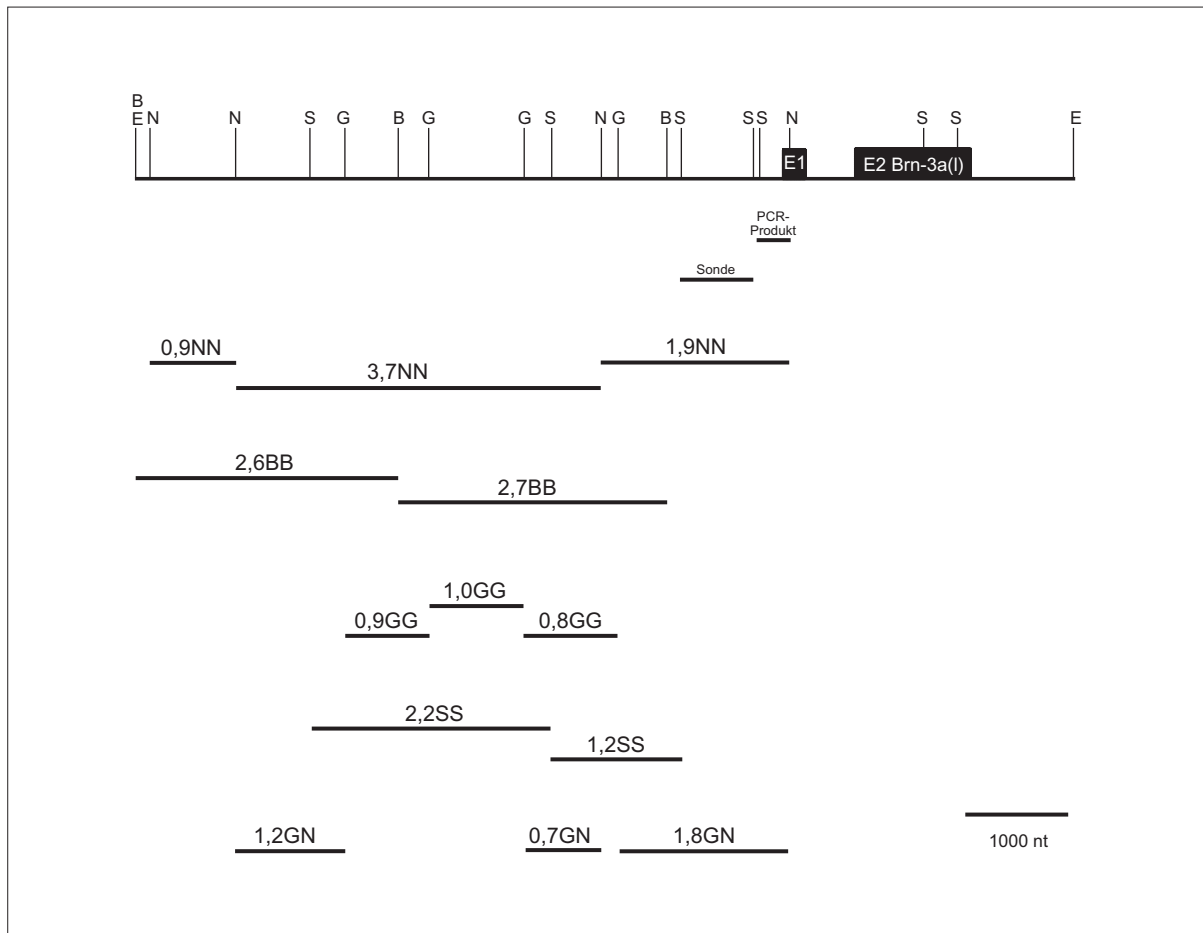


Abb. 2.2 Kartierung des 5' Bereichs des humanen Brn-3a Gens

Dargestellt ist der genomische Locus des humanen Brn-3a Gens. Mit E1 und E2 bezeichnete Bereiche kennzeichnen die Lage von Exon 1 und Exon 2 des humanen Brn-3a(l) Gens. Schnittstellen von Restriktionsendonukleasen sind eingezeichnet. Es werden folgende Abkürzungen verwendet: B=*Bam*HI, E=*Eco*RI, G=*Bgl*II, N=*Nsi*I und S=*Sac*I. Ebenfalls markiert ist die Lage des Amplikons aus der PCR Reaktion, die zur Detektion des Phagenklons verwendet wurde, und die 900 nt überspannende Sonde für die Hybridisierung der Phagenfilter. Unter der Restriktionskarte sind die Fragmente abgebildet, die in pBluescript-KS subkloniert wurden.

2.2. Ermittlung der Transkriptionsstartstellen des Brn-3a Gens

Die für die Regulation eines Gens wichtigen Sequenzen liegen oft in der Nähe des Transkriptionsstarts. Deshalb wurden zunächst die Startstellen der RNA ermittelt, um danach die Promotoraktivität in den angrenzenden Bereichen bestimmen zu können.

Zur Ermittlung des Transkriptionsstarts gibt es verschiedene Methoden wie Primer Extension, RNase Protektion, RL-PCR (Wahls, 1994), RACE-PCR (Schuster, *et al.*, 1992) und S1-Nuklease Abbau. Sie unterscheiden sich in ihrer Sensitivität, benötigen aber alle RNA hoher Qualität. Der Nachweis der Startstellen erfolgt bei fast allen Methoden auf die gleiche

Weise, die radioaktiv markierten Reaktionsprodukte werden in einem Acrylamidgel aufgetrennt. Bei der Primer Extension Reaktion wird ein radioaktiv markiertes, genspezifisches Oligodesoxynukleotid verwendet, welches an die mRNA angelagert und in einer reversen Transkriptionsreaktion verlängert wird, wobei die reverse Transkription am 5' Ende der RNA endet. Bei der RNase Protektion wird eine radioaktiv markierte 'antisense' RNA definierter Länge aus dem zu untersuchenden Bereich hergestellt, anschließend wird die Sonde mit mRNA hybridisiert. In einer RNase-Reaktion wird die einzelsträngige RNA abgebaut. Nicht abgebaut werden RNA-RNA Hybride, daher bleiben die Bereiche der radioaktiv markierten Antisense-RNA, die mit der mRNA des zu untersuchenden Gens hybridisieren, bestehen. Auf einem ähnlichen Prinzip beruht der S1-Nuklease Abbau. Hier wird eine radioaktiv markierte DNA-Sonde verwendet. Die Exonuklease S1 hydrolysiert einzelsträngige Nukleinsäuren, nicht aber DNA/DNA, DNA/RNA oder RNA/RNA Doppelstränge. Bei der RL-PCR werden die Enden der RNA dephosphoryliert, anschließend wird spezifisch die 'Cap'-Region, die sich am 5' Ende der mRNA befindet, hydrolysiert. Der dabei entstehende Phosphatrest am 5' Ende der RNA wird zur Ligation eines RNA-Primers an die RNA verwendet. In zwei aufeinander folgenden PCR Reaktionen, wobei die zweite Reaktion mit radioaktiven dNTPs durchgeführt wird, wird ein Produkt amplifiziert, dessen 3' Ende durch die genspezifischen Oligodesoxynukleotide bekannt ist. Die RACE-PCR beruht auf einem ähnlichen Prinzip: Die Terminale Transferase wird verwendet, um das 5' Ende der mRNA mit einem polyA-Schwanz zu versehen. Anschließend RT-PCR mit genspezifischem Primer und einem polyT-Primer, beide versehen mit Sequenzen für Restriktionsendonukleaseschnittstellen, und Klonierung der PCR Produkte geben die Möglichkeit zur Identifizierung des 5' Endes der mRNA.

Der Bereich, in dem die Startstelle vermutet wurde, lag in einer GC-reichen Region, welches zu Schwierigkeiten bei der Ermittlung der Startstellen führte. Ein weiteres Problem stellte die Verfügbarkeit von mRNA dar. Es gibt Brn-3a(l) exprimierende Zelllinien, die aus Neuroepitheliomen oder Ewingssarkomen etabliert wurden. Alle Brn-3a(l) exprimierenden Zelllinien (Expression getestet mit RT-PCR, Northern- und Westernblot, Daten nicht gezeigt) wurden mit RT-PCR auf die Expression von Brn-3a(k) untersucht. In keiner der Zelllinien konnte die

mRNA für das kurze Brn-3a Protein detektiert werden. Damit können die oben genannten Methoden, mit Ausnahme der RACE-PCR, zur Ermittlung der Startstellen der mRNA von Brn-3a(k) nicht angewandt werden, da das Ausgangsmaterial nicht in der nötigen Menge zur Verfügung stand.

2.2.1. Transkriptionsstartstellen von Brn-3a(l)

In Abb. 1.2 sind verschiedene DNA-Elemente dargestellt, die im Basalpromotor vorkommen können. Das am weitesten verbreitete DNA-Motiv im Promotorbereich ist die TATA-Box (Konsensussequenz TATAAAA). In der 5' Region des humanen Brn-3a(l) Gens, in der gewöhnlich die Initiation der Transkription stattfindet (bis ca. 100 nt vor dem Translations-initiationskodon), konnte durch Sequenzvergleich keine TATA-Box ermittelt werden. Promotoren ohne TATA-Box enthalten häufig mehrere Startstellen der Transkription (Smale, 1997). Die Startstellen der Transkription des humanen Brn-3a(l) Gens wurden mit Hilfe der Primer Extension Reaktion ermittelt. Dabei wurde eine reverse Transkription mit einem genspezifischen, radioaktiv markierten Oligodesoxynukleotid durchgeführt. Das Produkt der reversen Transkription endete am Anfang der mRNA. Durch die radioaktive Markierung kann die synthetisierte cDNA nach Auftrennung auf einem denaturierenden Gel und anschließender Autoradiographie sichtbar gemacht werden.

Zur Ermittlung der Startstellen von Brn-3a(l) wurden 50 µg Gesamt-RNA der humanen Brn-3a exprimierenden Zelllinie StaEt1 eingesetzt. Zur Kontrolle wurde die gleiche Menge Hefe tRNA und Gesamt-RNA aus der ebenfalls humanen, aber nicht Brn-3a exprimierenden, Zelllinie HeLa verwendet. Als radioaktiv markiertes Oligodesoxynukleotid diente das genspezifische Molekül H3APE4 (siehe Abb. 2.3). Die Anlagerungstemperatur für das Oligodesoxynukleotid lag bei 55 °C, die Sequenz des Oligodesoxynukleotids beginnt 164 nt 5' des Translationsinitiationskodons.

Die Größe der Signale auf dem Autoradiogramm in Abb. 2.3 konnten mit Hilfe des Computerprogramms Tina der Firma Raytest bestimmt werden. Dazu wurden die Signale

des ebenfalls radioaktiv markierten Größenstandards als Referenzwerte verwendet. Es konnten insgesamt vier Signale im Abstand von 252 nt, 299 nt, 406 nt und 727 nt vor dem Translationsinitiationskodon ermittelt werden. Da es sich bei diesen Signalen prinzipiell auch um Produkte einer unvollständigen reversen Transkription handeln könnte, wurde ein weiteres Experiment zur Funktionalität der ermittelten Startstellen durchgeführt.

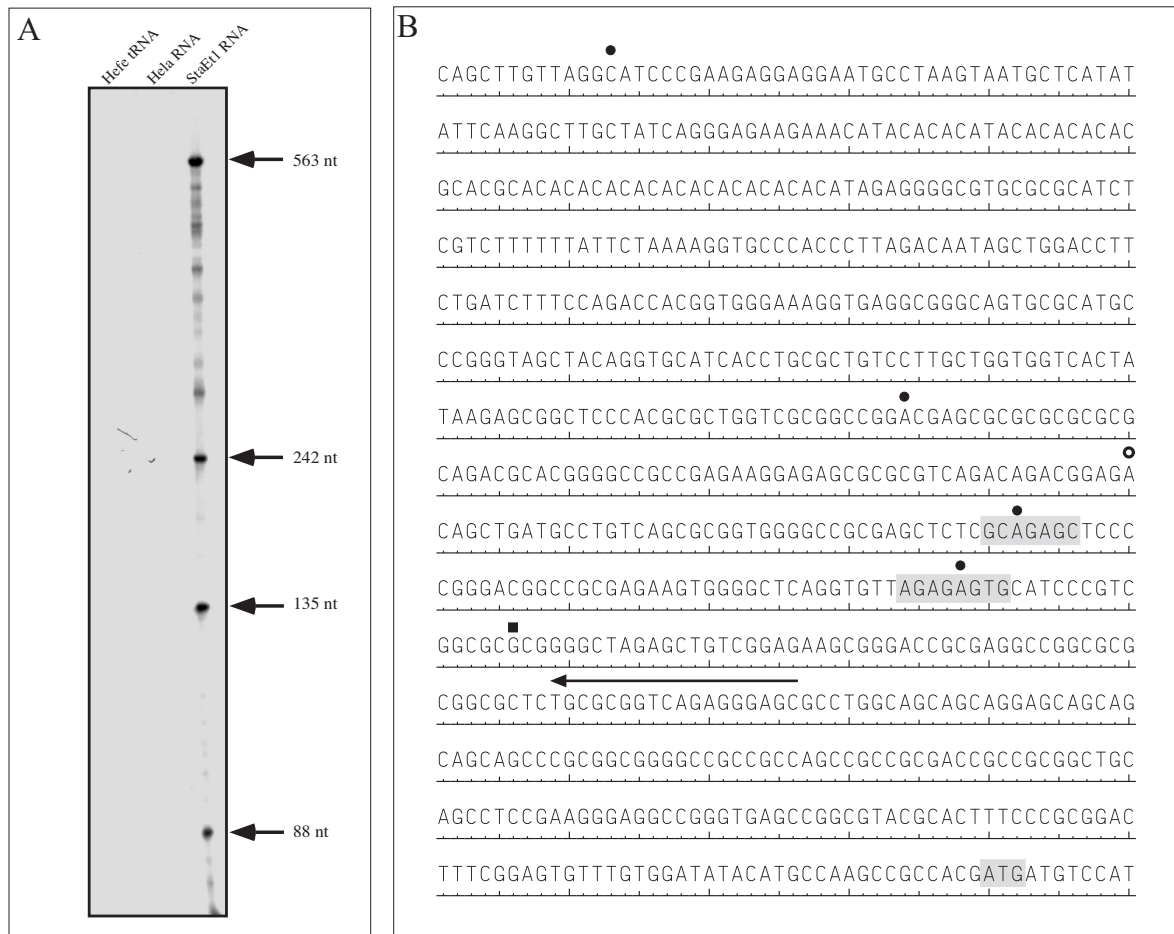


Abb. 2.3 Startstellen von Brn-3a(l)

A) Die Startstellen von Brn-3a(l) wurden mit einer Primer Extension Reaktion ermittelt. Das Oligodesoxynukleotid H3APE4 wurde radioaktiv markiert. Als Matrize für die DNA-Synthese wurden 50 µg Gesamt-RNA aus StaEt1 Zellen verwendet. Als Negativkontrollen diente die gleiche Menge Gesamt-RNA aus HeLa Zellen bzw. Hefe tRNA. Die auf der rechten Seite angegebenen Größen beziehen sich auf die Lage des Primers. B) Dargestellt ist die 5' Sequenz des humanen Brn-3a(l) Gens. Die Position der Startstellen ist durch geschlossene Kreise symbolisiert. Der offene Kreis markiert die Stelle, die das Programm „Promoter 2.0“ (siehe Tab. 2.1) als Startstelle der Transkription ermittelt hat. Das schwarze Quadrat befindet sich an der Stelle, an der die publizierte cDNA von hBrn-3a(l) endet. Der Pfeil gibt die Position des Oligodesoxynukleotids H3APE4 an, das für die Primer Extension Reaktion verwendet wurde. Die grau unterlegten Sequenzen sind von oben nach unten: INR Element, DPE und das Translationsinitiationskodon von Brn-3a(l).

Man kann DNA-Regionen, in denen ein Promotor vermutet wird, auf ihre Fähigkeit, die Transkription eines Gens zu aktivieren, untersuchen. Die Menge des Genprodukts läßt

direkte Rückschlüsse auf die Promotoraktivität der getesteten DNA-Sequenz zu. In diesem Experiment wurde ein Gen verwendet, das für ein Enzym leicht nachweisbarer Aktivität kodiert. In den letzten Jahren hat sich das Luziferasegen als sogenanntes Reportergen durchgesetzt. Das Reportergenkonstrukt wird in eukaryotische Tumorzelllinien transfiziert, nach einer 18-28 stündigen Inkubationszeit werden die Zellen lysiert und die Reportergenaktivität im Zelllysate gemessen.

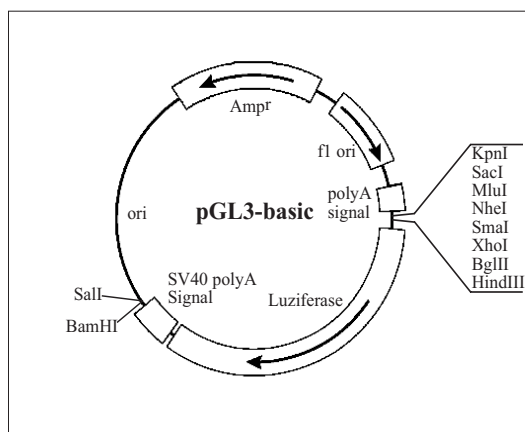


Abb. 2.4 Vektor für Reportergenkonstrukte

Dieser Vektor wurde zur Erzeugung von Reportergenkonstrukten verwendet. Vor der für das Luziferase-reportergen kodierenden cDNA liegt die Klonierungskassette, deren Restriktionsendonukleaseschnittstellen zum Einfügen des zu untersuchenden Bereichs verwendet werden. 3' des Luziferasegens befindet sich ein SV40 polyA Signal, das zur Polyadenylierung der mRNA des Reportergens dient. Vor der Klonierungskassette liegt ein synthetisches Polyadenylierungssignal, das etwaige Transkriptionsinitiation vor dem zu testenden Promotorbereich, und damit den Hintergrund der Transkription und der daraus folgenden basalen Reporteraktivität vermindert. Als Kontrollplasmid wurde pGL3-promoter (pGL3prom) verwendet.

Es unterscheidet sich vom abgebildeten Vektor durch den SV40 Promotor, der zwischen der *Bgl*II und der *Hind*III Schnittstelle liegt. Beim pGL3prom Konstrukt können DNA-Sequenzen daraufhin überprüft werden, ob sie auch auf Distanz wirksam sind. Dazu wird die zu untersuchende Sequenz zwischen die *Sal*I und *Bam*HI Schnittstelle von pGL3prom kloniert, die Reportergenaktivität wird mit der des Ausgangskonstrukts verglichen.

Zur Generierung des Reportergenkonstruktes PL3 wurde ein 343 nt langes *Pvu*II/*Ms*I DNA-Fragment aus der 5' Region des humanen Brn-3a Gens in den Vektor pGL3-basic kloniert. Das 3' Ende des Fragments beinhaltet das Adenin des Translationsinitiationskodons von Brn-3a(1). Weiterhin wurden zwei 5' Deletionsmutanten von PL3 mittels PCR generiert. Dem Konstrukt PL4 fehlen 11 nt am 5' Ende im Vergleich zu PL3, dem Plasmid PL5 fehlen 27 nt am 5' Ende. Zur Generierung der PCR-Fragmente wurden die Oligodesoxynukleotide PCR-PL4-AP1 (PL4) und PCR-PL4-AP2 (PL5) sowie PCR-PL3' (PL4, PL5) verwendet. Die PCR-Produkte wurden mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Kpn*I in den pGL3-basic Vektor inseriert. Das Konstrukt PL6 enthält ein *Sac*I/*Ms*I-Fragment und ist am 5' Ende um 18 nt kürzer als PL5. Die Lage der DNA-Inserts der Konstrukte ist in Abb. 2.7 dargestellt. Abb. 2.5 zeigt die relative Promotoraktivität der Reportergenkonstrukte in StaEt1 Zellen.

In diesem und allen folgenden Experimenten wurde die Reportergenaktivität der zu testenden Konstrukte über den Wert des Kontrollplasmids pGL3prom normiert, das neben dem Luziferasegen den SV40 Promotor beinhaltet. Die Promotoraktivität von pGL3prom wurde 100 % gesetzt, alle Prozentangaben in Reportergenexperimenten in dieser Arbeit beziehen sich auf die 100 % Marke dieses Kontrollplasmids. Es sind ausschließlich Experimente abgebildet, bei denen die Standardabweichung des pGL3prom geringer als 5 % war. In Vorversuchen wurde zusätzlich zu den Luziferasekonstrukten als weiteres Markergen ein β -Galaktosidase Expressionskonstrukt transfiziert. Neben der Luziferaseaktivität wurde in den gleichen Ganzzelextrakten die β -Galaktosidaseaktivität gemessen. Die Normierung über die β -Galaktosidaseaktivität verringerte den Fehler des Experiments jedoch nicht, weshalb im weiteren auf eine zusätzliche Normierung über die β -Galaktosidaseaktivität verzichtet wurde. Gezeigt sind repräsentative Experimente in Triplikaten mit den jeweiligen Standardabweichungen als Fehlerbalken.

Alle Reportergenkonstrukte wurden, soweit das möglich war, systematisch benannt:

P = pGL3-basic Vektor

P...prom = pGL3prom Vektor

EP...prom = Insert befindet sich in der Enhancerstelle von pGL3prom

L = zu untersuchende DNA stammt aus dem 5' Bereich von Brn-3a(l)

K = zu untersuchende DNA stammt aus dem 5' Bereich von Brn-3a(k)

S = S24 ist im Konstrukt enthalten

Ziffer = fortlaufende Beschriftung der Konstrukte.

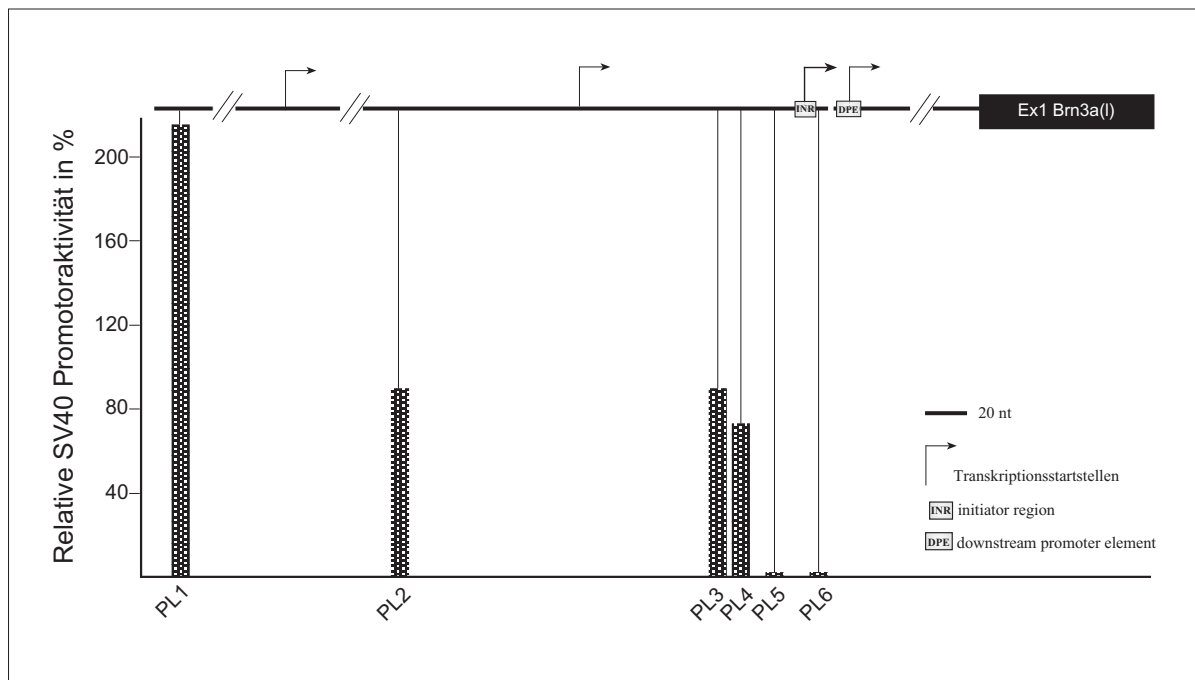


Abb. 2.5 Korrelation von Startstellen und Reporterogenaktivität von Brn-3a(l)

Die Startstellen von Brn-3a(l) sind als Pfeile dargestellt. Ebenfalls eingezeichnet sind die Bereiche in der 5' Region von Brn-3a(l), in denen die Konsensussequenzen für ein INR Element (initiator region) und ein DPE (downstream promoter element) liegen. Das 3' Ende aller abgebildeten Reportergenkonstrukte ist das Adenin des Translationsinitiationskodons. Die Position der Balken für die einzelnen Konstrukte gibt ihr 5' Ende wieder. Die Höhe der Balken zeigt die relative Promotoraktivität der Reportergenkonstrukte in Transfektionsexperimenten bezogen auf die Aktivität des SV40 Promotors. Eine genauere Darstellung der experimentellen Daten ist in Abb. 2.8 gezeigt.

Abbildung 2.5 zeigt, daß die Konstrukte PL3 und PL4 eine Promotoraktivität aufweisen, die bei ca. 90 % bzw. 73 % der Promotoraktivität des SV40 Promotors in dieser Zelllinie liegen. Das im Vergleich mit PL4 um 16 nt kürzere Konstrukt PL5 zeigt eine Promotoraktivität, die bei nur noch 2 % der Aktivität des SV40 Promotors liegt, ebenso die Aktivität des um weitere 18 nt kürzeren Plasmids PL6. PL5 endet mehr als 50 nt entfernt von dem am nächsten am Startkodon liegenden Primer Extension Produkt. Diese mehr als 50 nt bieten genügend Raum zur Positionierung der Transkriptionsmaschinerie und der Bindung von Aktivatoren an die DNA. Es handelt sich also bei diesem Primer Extension Produkt wahrscheinlich nicht um eine Startstelle der Transkription, sondern um ein Abbruchprodukt der Reversen Transkription. Eine Verlängerung des Konstruktes PL3 in 5' Richtung in Form des Plasmids PL2 (*SphI/MsII*-Fragment) zeigt keine weitere Erhöhung der Reporterogenaktivität gegenüber PL3. Dies läßt darauf schließen, daß die Startstelle, die sich zwischen diesen beiden Reportergenkonstrukten befindet, entweder nicht entscheidend für die Transkription von Brn-3a(l) oder keine Startstelle der Transkription ist. PL1 beinhaltet die

Startstelle bei 727 nt, hier ist die Promotoraktivität ungefähr doppelt so hoch wie die SV40 Promotoraktivität. Die Startstelle der Transkription, die an Position 299 nt vor dem Translationsinitiationskodon ermittelt wurde, liegt zwischen PL5 und PL6. Das Konstrukt PL5 enthält diese Startstelle, allerdings nur 11 nt in 5' Richtung der Startstelle. Dies ist offenbar zu wenig, um die Transkriptionsmaschinerie entsprechend zu positionieren und Aktivatoren zu binden.

Neben der TATA-Box als DNA-Motiv an Startstellen der Transkription gibt es weitere DNA-Motive, die bei der Initiation der Transkription eine Rolle spielen wie beispielsweise das INR Element (initiator region) (Smale, 1997), das DPE (downstream promoter element) (Smale, 1997) oder die CAAT-Box (Konsensussequenz CAAT). Die Konsensussequenz für das INR Element ist (Py) Py A+1 N T/A Py (Py). An der Startstelle, die 299 nt vor dem Translationsinitiationskodon liegt, konnte durch Sequenzvergleich ein solches INR Element ermittelt werden. Die Sequenz des Brn-3a Gens an der entsprechenden Stelle lautet GCAGAGC. Die für die Funktionalität eines INR Elements wichtige Sequenz stimmt mit der entsprechenden Sequenz in der 5' Region des Brn-3a(l) Gens überein. Mit dem INR Element tritt häufig ein DPE als weiteres DNA-Motiv auf. Es ist etwa 30-50 nt stromabwärts des mRNA Starts lokalisiert und tritt ausschließlich in Verbindung mit dem INR Element auf. Die Konsensussequenz für dieses DNA-Motiv lautet: A/G G A A/T C G T G, die entsprechende Sequenz aus dem Brn-3a Promotor: AGAGAGTG. Sie stimmt also nicht genau mit der Konsensussequenz überein. Die Lage des INR Elements und des DPE ist in Abb. 2.3.B eingezeichnet.

2.2.2. Transkriptionsstartstellen von Brn-3a(k)

Die Ermittlung des Transkriptionsstarts des humanen Brn-3a(k) Gens wirft das Problem auf, daß Brn-3a(k) nur in embryonalem Rückenmark exprimiert wird. In kommerziell erhältlicher polyA⁺RNA aus embryonalem Gehirn konnte kein Transkript von Brn-3a(k) detektiert werden. Auch 5' verankerte PCR und anschließende Klonierung der PCR-Produkte führte nicht zu Brn-3a(k) spezifischen Konstrukten. Diese Schwierigkeiten beim Nachweis von

Brn-3a(k) sind wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß die Transkription von Brn-3a(k) während der Embryonalentwicklung sowohl zeitlich als auch räumlich stark limitiert ist. Da kein entsprechendes Ausgangsmaterial zur Bestimmung der Startstellen des humanen Brn-3a(k) verfügbar war, wurde das Reportergenkonstrukt PK1C (siehe Abb. 2.11) in StaEt1 und ND7 Zellen transfiziert. Dieses Konstrukt enthält einen Teil vom Exon 1 des Brn-3a(l) Gens und das gesamte Intron, in dem der Transkriptionsstart von Brn-3a(k) mit großer Wahrscheinlichkeit liegt. Das Konstrukt PK1C zeigt eine starke Promotoraktivität, die etwa mit der des SV40 Promotors vergleichbar ist. Dieses Konstrukt wurde gewählt, weil der Bereich, in dem die Transkription von Brn-3a(k) startet, durch die Sequenz von Brn-3a(l) begrenzt ist, und fast die gesamte mögliche Sequenz für Transkriptionsstartstellen von Brn-3a(k) in PK1C vorhanden ist.

Da auch dieses durch transiente Transfektion erlangte Ausgangsmaterial limitiert ist, wurde die Methode der 5' verankerten PCR verwendet, für die eine cDNA-Synthese mit 2 µg Gesamt-RNA durchgeführt wurde. Um nur spezifische cDNA-Moleküle zu erhalten, wurde ein genspezifisches Oligodesoxynukleotid aus dem Luziferasegen als Startermolekül für die reverse Transkription verwendet. Die einzelsträngigen cDNAs wurden an ihrem 5' Ende mit einem polydA-Ende versehen und anschließend in PCR Reaktionen eingesetzt. Die Amplikons wurden erneut in einer PCR Reaktion amplifiziert. Dazu wurde ein 3' Oligodesoxynukleotid verwendet, welches etwas weiter stromaufwärts liegt als das 3' Oligodesoxynukleotid der ersten PCR Reaktion, um die Spezifität der Reaktion zu erhöhen. Die PCR-Produkte der zweiten PCR Reaktion wurden in den Vektor pBluescript-KS inseriert und sequenziert. Es konnten zwei Konstrukte generiert werden, die beide das gleiche 5' Ende aufwiesen. In Abb. 2.6 ist die Lage dieses 5' Endes der cDNA als schwarzer Kreis abgebildet. Das cDNA-Ende liegt 583 nt vor dem Translationsinitiationskodon von Brn-3a(k). In einer Primer Extension Reaktion (durchgeführt von Dr. L. Vaßen) mit der gleichen mRNA konnten mehrere Startstellen der Transkription gezeigt werden, die im gleichen Bereich wie das durch die RACE-PCR gefundene 5' Ende der mRNA liegen. Da der Promotor von Brn-3a(k) ebenso wie der von Brn-3a(l) keine Konsensussequenz für eine

TATA-Box aufweist, ist es durchaus möglich, daß auch die Transkription von Brn-3a(k) an mehreren Stellen beginnt.



Abb. 2.6 Sequenz des 5' Bereichs von Brn-3a(k)

Dargestellt ist die Sequenz im 5' Bereich des humanen Brn-3a(k) Gens. Am Ende der abgebildeten Sequenz liegt das Exon 2 des Brn-3a(l) Gens. Brn-3a(l) Sequenzen sind grau unterstrichen. Innerhalb von Exon 2 von Brn-3a(l) liegt das Translationsinitiationskodon von Brn-3a(k), grau unterlegt. Das Ende der beiden RACE-PCR-Klone ist durch einen schwarzen Kreis gekennzeichnet. Die Lage der durch Primer Extension ermittelten Startstellen der Transkription wurden durch offene Kreise markiert.

Für den Promotor von Brn-3a(k) konnte weder ein DPE noch ein INR Element ermittelt werden. Keiner der beiden Promotoren enthält eine CAAT-Box, die bei einigen Promotoren etwa 75 nt stromaufwärts des Transkriptionsstarts zu finden ist.

2.2.3. Computergestützte Analyse der Startstellen von Brn-3a

Neben dem biochemischen Nachweis von Promotorregionen gibt es einige Computerprogramme, die Promotorbereiche in DNA-Sequenzen erkennen können. Diese Programme verwenden unterschiedliche Annahmen und Algorithmen zur Vorhersage von Promotoren. Im Augenblick sind die zur Verfügung stehenden Programme weit davon entfernt, alle

Promotoren korrekt identifizieren zu können, deshalb können die Ergebnisse der Sequenzanalyse mit diesen Computerprogrammen nur Hinweise auf das Vorhandensein Promotoren und die Lokalisation von Startstellen sein.

Programm	Homepage	Brn-3a(l)	Brn-3a(k)
Promoter 2.0	www.cbs.dtu.dk/services/Promoter	bei nt 800 hohe Wahrscheinlichkeit für Transkriptionsstart	kein Promotor
Proscan: Version 1.7	bimas.dcert.nih.gov:80/molbio/signal/	kein Promotor	kein Promotor
FunSiteP 2.1	transfac.gbf.de/programs/funsitep/fsp.html	4 Startstellen der Transkription, unsicher	1 Startstelle der Transkription, unsicher
Promoter Inspektor	genomatix.gsf.de/promoterinspector	kein Promotor	Promotor von nt 1-236 CpG von nt 102-398
Experimentelle Daten		2-4 Startstellen Promotoraktivität	mind. 1 Startstelle Promotoraktivität

Tab. 2.1 Promotoranalyse mit Hilfe von Computerprogrammen

Angegeben sind die Programme, mit denen nach Promotorregionen in dem 5' Bereich von Brn-3a(l) und Brn-3a(k) gesucht wurde. Bei dieser Art der Promotoranalyse wurden die Sequenzen aus Abb. 2.3 und Abb. 2.6 verwendet.

Obwohl nicht alle Programme in den überprüften Sequenzbereichen von Brn-3a(l) und Brn-3a(k) Promotoren ermitteln konnten, stimmen die Ergebnisse aus den Programmen, die Promotoren detektieren konnten, sehr gut mit den experimentellen Daten überein.

2.3. Promotoraktivität von Brn-3a

Die Aktivität von Promotorregionen kann mit Hilfe von Reportergenkonstrukten gemessen werden. In der Region um die Transkriptionsstartstelle binden Aktivatoren bzw. Repressoren der Transkription. Durch die Deletion solcher Bindungsstellen wird die Transkriptionsrate erniedrigt bzw. erhöht; gemessen wird die Enzymaktivität eines Reporters, in diesem Falle die der Luziferase. Desweiteren kann die gewebespezifische Transkription von Genen in unterschiedlichen Zelllinien untersucht werden. Dabei ist es notwendig, daß sich unter den

verwendeten Zelllinien mindestens eine befindet, die das zu untersuchende Gen exprimiert, um etwaige gewebespezifische Transkription von nicht gewebespezifischer Expression unterscheiden zu können. Deshalb mußte zunächst untersucht werden, welche der vorhandenen humanen Ewingssarkom- und Neuroepitheliomzelllinien Brn-3a exprimiert. Sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene konnte gezeigt werden, daß die drei Zelllinien StaEt1, Sal2 und RDES Brn-3a(l) exprimieren (Daten nicht gezeigt). Da die Zelllinie StaEt1 in Vorversuchen die höchste Transfektionseffizienz zeigte, wurde diese Tumorzelllinie in den Reporterexperimenten verwendet. Um etwaige für die Gewebespezifität wichtigen Bereiche identifizieren zu können, wurden die Konstrukte auch in eine Zelllinie transfiziert, die nicht neuronalen Ursprungs ist, in die humane Zervixkarzinomzelllinie HeLa.

2.3.1. Promotoraktivität von Brn-3a(l)

Zur Untersuchung der Promotoraktivität wurden Konstrukte verwendet, die mit dem Vektor pGL3-basic hergestellt wurden. Abb. 2.7 zeigt die Reportergenkonstrukte, die für die Promotoranalyse der langen Form des Brn-3a Gens generiert wurden. Alle Konstrukte wurden durch direkte Insertion des entsprechenden DNA-Fragments in den pGL3-basic Vektor oder durch Umklonierung aus dem Klonierungsvektor pSL1180 generiert. In der Regel sind alle zur Generierung der entsprechenden Reportergenkonstrukte wichtigen Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen in der genomischen Region im oberen Teil der Abbildungen eingezeichnet.

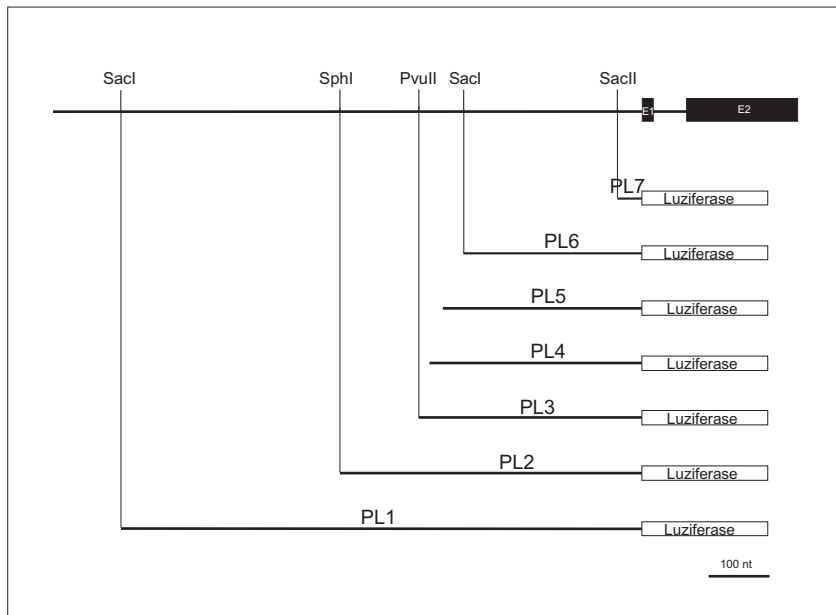


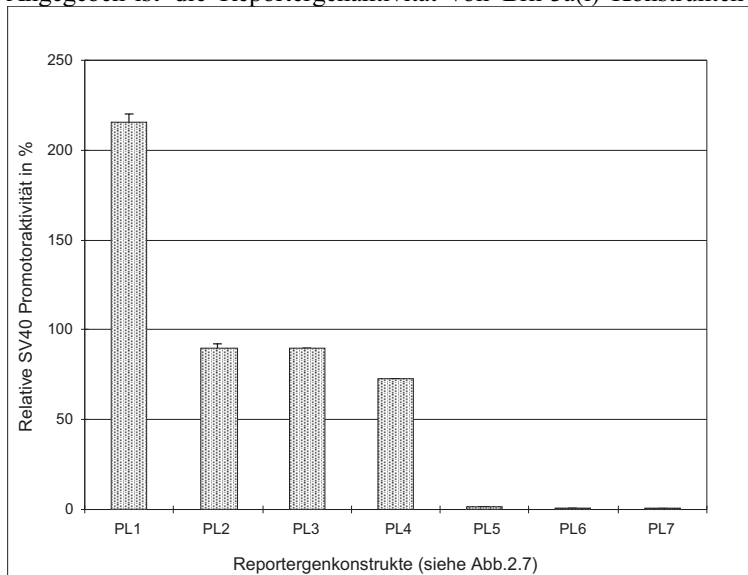
Abb. 2.7 Reportergenkonstrukte für Brn-3a(l)

Abgebildet ist die genomische Organisation des humanen Brn-3a(l) Gens. Die schwarzen Balken symbolisieren Exon 1 und Exon 2. Eingezeichnet sind die Restriktionsendonukleaseschnittstellen, die zum Generieren der entsprechenden Reportergenkonstrukte verwendet wurden. Das 3' Ende aller Konstrukte ist das Adenin des Translationsinitiationskodons (ATG). Die entsprechenden DNA-Fragmente wurden in den Vektor pGL3-basic (siehe Abb. 2.4) kloniert.

Als Transfektionsmethode wurde die Elektroporation verwendet. Dazu wurden $5 \cdot 10^6$ Zellen in 180 μ l Medium (ohne Zusätze) resuspendiert, mit 6 μ g der entsprechenden Plasmid-DNA versetzt und bei 260 V, 500 μ F elektroporiert. Nach 18-28 Stunden wurden die Zellen geerntet und lysiert. Im Lysat wurde die Reportergenaktivität gemessen.

Abb. 2.8 Reportergenaktivität des 5' Bereichs von Brn-3a(l)

Angegeben ist die Reportergenaktivität von Brn-3a(l) Konstrukten aus Abb. 2.7 in der Brn-3a(l) exprimierenden Tumorzelllinie StaEt1. 6- μ g des Reportergenkonstrukts wurden in $5 \cdot 10^6$ Zellen transfiziert und in eine Vertiefung einer 6-Loch-Platte ausgesät. Nach 28 Stunden wurden die Zellen lysiert. Im Lysat wurde die Luciferaseaktivität gemessen. Auf der Ordinate ist angegeben, zu welchem Prozentsatz die Brn-3a(l) Reporter die Aktivität eines SV40 Promotor getriebenen Reporters erreichen. Von den experimentell für die Reportergenkonstrukte ermittelten Relativen Licht Einheiten (RLUs) wurde die Hintergrundaktivität des Leervektors, entstanden durch nicht aktivierte Transkription, subtrahiert. Anschließend wurden die Daten über die Aktivität des SV40 Promotors normiert. Dies war notwendig, um Daten



aus verschiedenen experimentellen Ansätzen miteinander vergleichen zu können. Die Reportergenaktivität der Konstrukte nimmt mit der von 5' nach 3' progressiven Deletion des Promotorbereichs des Brn-3a(l) Gens ab. Mit der Deletion von Startstellen der mRNA geht ein enormer Verlust von Reportergenaktivität einher. Die RLU's der Reporter PL5 bis PL7 liegen in der gleichen Größenordnung wie die des Leervektors.

Abb. 2.8 zeigt die Promotoraktivität von Deletionsmutanten des Promotors von Brn-3a(l). Der zwischen den Konstrukten PL4 und PL5 auftretende Abfall der Luziferaseaktivität ist darauf zurückzuführen, daß bei der Verkürzung von PL4 nach PL5 eine putative Startstelle der Transkription deletiert wird, die essentiell für die Transkription von Brn-3a sein könnte (siehe Abschnitt 2.2.1 und Abb. 2.5). Eine Verlängerung in 5' Richtung zeigt einen Anstieg der Promotoraktivität von Brn-3a(l) von Konstrukt PL2 zu PL1. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß bei der Verlängerung der Reportergenkonstrukte um 640 nt in 5' Richtung die am weitesten vom Translationsinitiationskodon entfernte Startstelle der Transkription im Konstrukt enthalten ist, oder daß in diesem Bereich Aktivatoren der Transkription binden.

Die hohe Reportergenaktivität im untersuchten Bereich des humanen Brn-3a Lokus bestätigt die Daten aus Abschnitt 2.1.1. Der Bereich, in dem die Startstellen der Transkription liegen repräsentiert daher mit hoher Wahrscheinlichkeit den Promotorbereich des humanen Brn-3a Gens. In Reportergenexperimenten ist der Promotor in beiden Zelllinien, der Brn-3a exprimierenden Linie StaEt1 und der Brn-3a nicht exprimierenden Zelllinie HeLa (Daten nicht gezeigt) gleich aktiv. Im untersuchten, 1140 nt langen Bereich gibt es also keine gewebespezifische Aktivierung bzw. Repression der Promotoraktivität von Brn-3a. Dies läßt weiter entfernte 5' oder 3' Bereiche für diese Regulation verantwortlich erscheinen.

2.3.2. Promotoraktivität von Brn-3a(k)

Zur funktionellen Charakterisierung der Promotorregion von Brn-3a(k) wurden von 5' nach 3' und ebenso von 3' nach 5' progressiv deletierte Bereiche des Brn-3a Gens in den Reportergenvektor pGL3-basic inseriert.

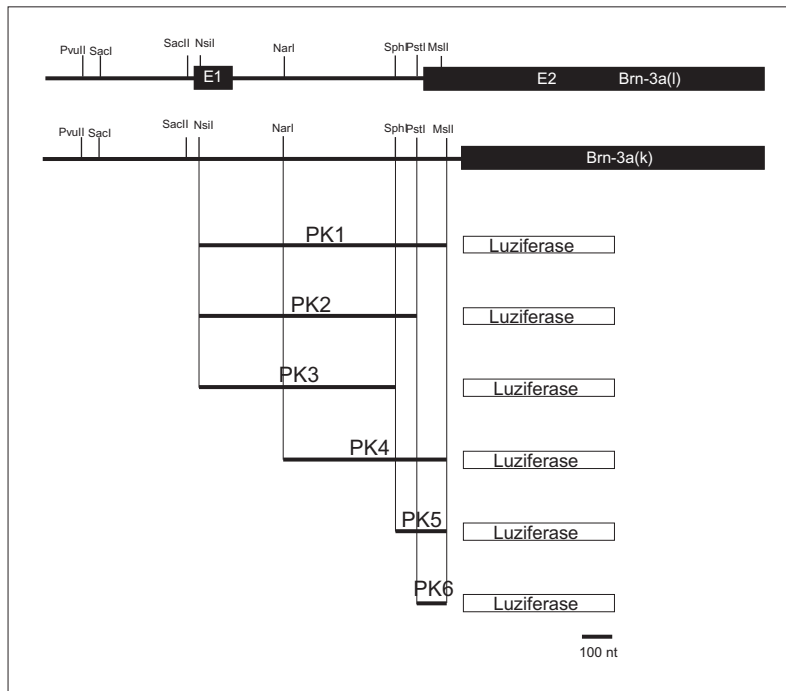


Abb. 2.9 Reporter-Genkonstrukte zur Bestimmung der Promotoraktivität der 5' Region von Brn-3a(k)

Angegeben ist die genomische Organisation von Brn-3a(l) und Brn-3a(k). Die Transkription von Brn-3a(k) startet im Intron von Brn-3a(l) (siehe Abb. 2.6). Als Translationsinitiationskodon wird ein ATG Triplet verwendet, das 132 nt hinter dem Intron/Exon 2-Übergang liegt. Die Konstrukte wurden mit den angegebenen Enzymen entweder direkt oder durch Umklonierung aus dem Vektor pSL1180 generiert. Als Vektor wurde der Luciferasereporter-Genvektor pGL3-basic (Abb. 2.4) verwendet.

Beim Entwerfen der Konstrukte wurde darauf geachtet, daß ihre Ausdehnung in den 5' Bereich nicht über das Translationsinitiationskodon von Brn-3a(l) hinausgeht, um eine Translationsinitiation ausschließlich am Luciferasegen zu gewährleisten. Bei dieser Vorgehensweise ist zu berücksichtigen, daß die Startstellen der Transkription für Brn-3a(k) 3' von Exon 1 von Brn-3a(l) liegen.

Die Konstrukte wurden in die beiden Zelllinien StaEt1 und HeLa transfiziert, und die Reporter-Genaktivität in Zellysaten gemessen. Auch hier wurden die Aktivitäten der Reporter-Genkonstrukte auf die Aktivität des im pGL3prom aktiven SV40 Promotors bezogen.

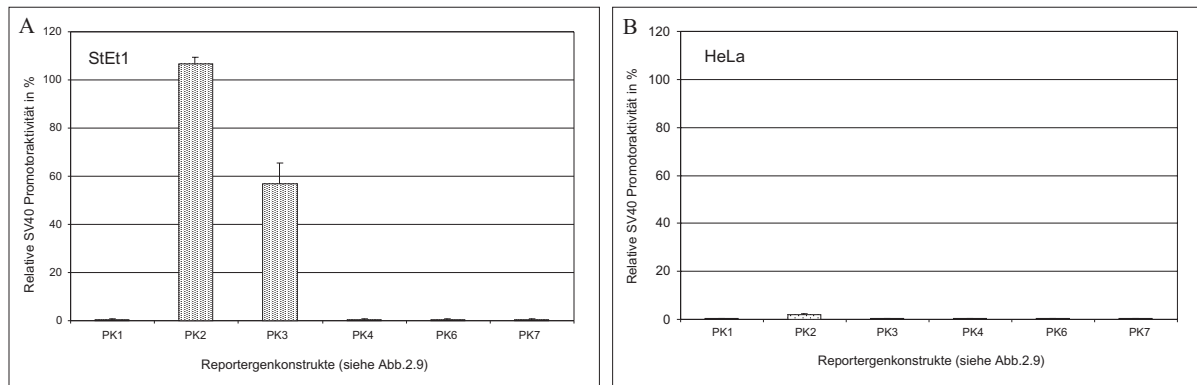


Abb. 2.10 Reporterogenaktivität der 5' Region von Brn-3a(k)

Angegeben ist die Promotoraktivität der in Abb. 2.9 gezeigten Reportergenkonstrukte in Prozent der SV40 Aktivität. 28 Stunden nach Transfektion von 6 µg DNA in $5 \cdot 10^6$ StaEt1 bzw. HeLa Zellen wurden Proteinextrakte hergestellt. Die Aktivität des Reportergens Luciferase wurde ermittelt und über die Aktivität des SV40 Promotors normiert.

A) Reporterogenaktivität in StaEt1 Zellen. Nur Konstrukte, die einen 75 nt langen Bereich am 3' Ende nicht beinhalten, zeigen überhaupt Reporterogenaktivität.

B) Reporterogenaktivität der gleichen Konstrukte in HeLa Zellen. In dieser Zelllinie ist nur eine basale Promotoraktivität zu messen. Die Promotoraktivität liegt nur noch bei maximal 2 % von der in StaEt1 Zellen.

Die Konstrukte PK1 und PK2 unterscheiden sich nur durch 75 nt. Alle Konstrukte, die diese 75 nt lange Sequenz beinhalten, zeigen keinerlei Promotoraktivität. Zwischen PK2 und PK3 fällt die Promotoraktivität von 100 % auf 60 % ab, was darauf zurückzuführen sein könnte, daß im deletierten DNA Bereich ein wichtiger Aktivator der Transkription bindet. Bemerkenswert ist auch die geringe Promotoraktivität, die die Konstrukte PK2 und PK3 in HeLa Zellen zeigen. HeLa Zellen entstammen einem humanen Zervixkarzinom und weisen keine nachweisbare Brn-3a Expression auf. Die geringe Promotoraktivität in dieser Zelllinie deutet auf einen Faktor hin, der innerhalb der untersuchten Sequenz bindet und die Promotoraktivität gewebespezifisch moduliert. Um den Bereich zwischen PK1 und PK2 genauer untersuchen zu können, wurden weitere Reportergenkonstrukte generiert.

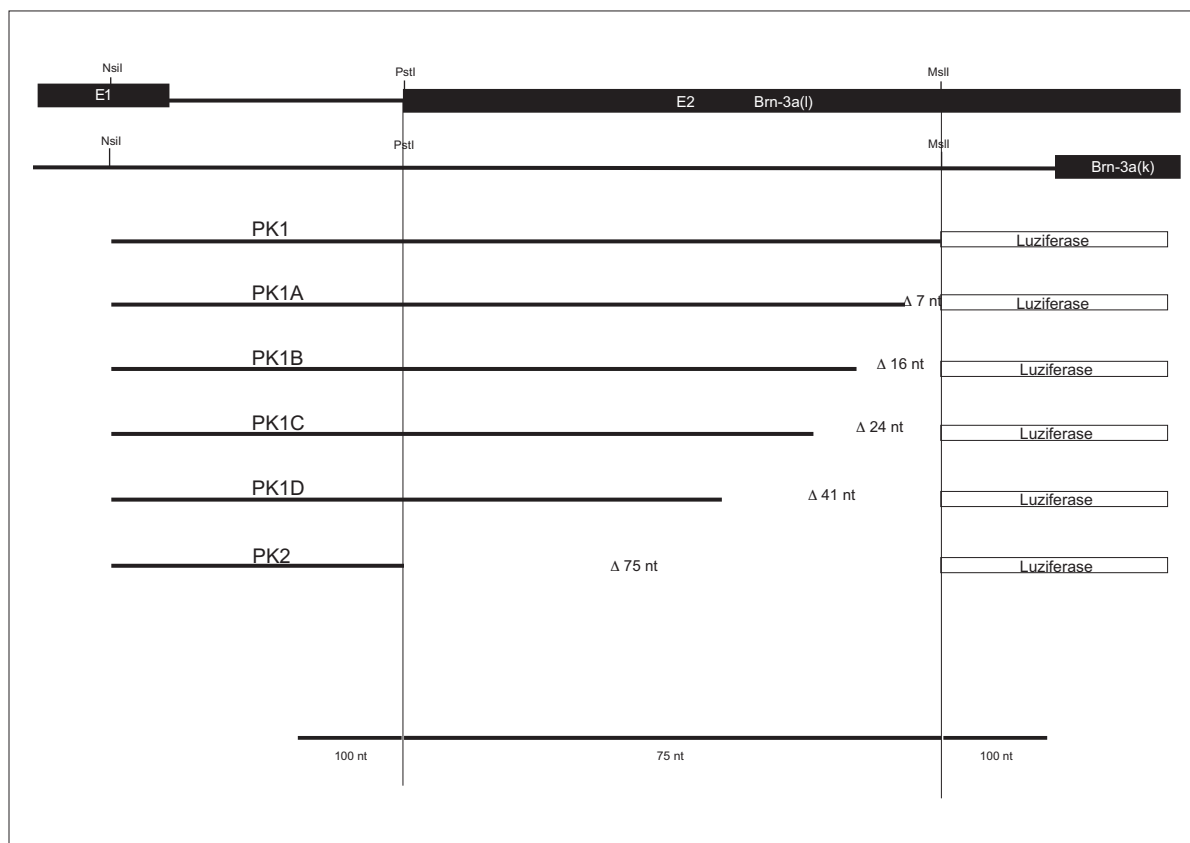


Abb. 2.11 Reportergenkonstrukte zur genaueren Charakterisierung des Promotors von Brn-3a(k)

Mittels PCR basiertem Verfahren wurden Konstrukte mit den angegebenen verkürzten Bereichen generiert. Alle Konstrukte enden an der *NsiI* Schnittstelle im Exon 1 von Brn-3a(l). Sie wurden mit Hilfe der Enzyme *NsiI* und *BamHI* in den pGL3-basic Vektor kloniert. Zur besseren Visualisierung der Unterschiede der Konstrukte wurden zwei Größenskalen verwendet, der Bereich zwischen der *PstI* Schnittstelle und der *MsiI* Schnittstelle wurde vergrößert dargestellt.

Die Fragmente für die Konstrukte PK1A-PK1D wurden mit Hilfe der Oligodesoxynukleotide PL8f und PL8.1 -PL8.5 über PCR amplifiziert, mit den Restriktionsendonukleasen *NsiI* und *BamHI* verdaut und in den pGL3-basic Vektor inseriert, die Oligodesoxynukleotide PL8.1-PL8.5 enthalten am Ende eine *BamHI* Schnittstelle zur Klonierung.

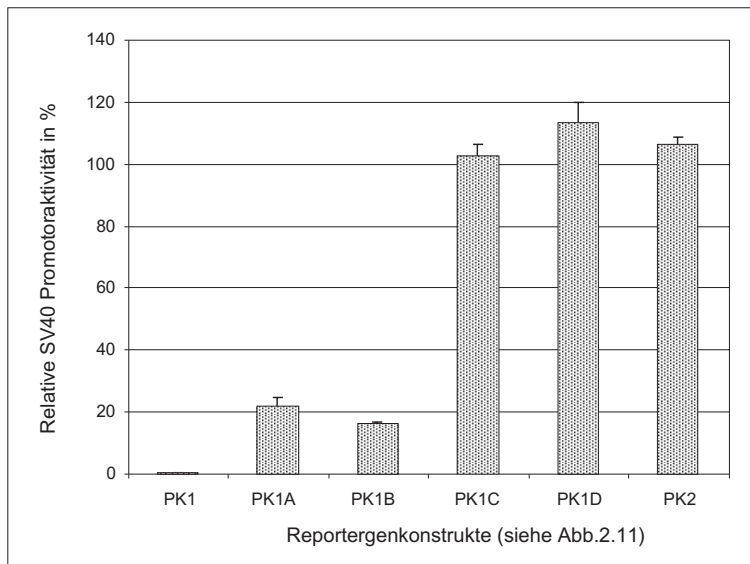


Abb. 2.12 Reporterogenaktivität von Brn-3a(k) Konstrukten

Angegeben ist die Promotoraktivität der in Abb. 2.11 gezeigten Reporter-genkonstrukte nach Transfektion in StaEt1 Zellen. Das längste und das kürzeste Konstrukt unterscheiden sich durch einen 75 nt langen Bereich am 3' Ende. Die beiden kürzesten Konstrukte nach PK1, PK1A und PK1B, denen 7 nt bzw 16 nt am 3' Ende fehlen, zeigen noch eine geringe Promotoraktivität. PK1C, dem 24 nt am 3' Ende fehlen hat eine Promotoraktivität, die genauso hoch wie die von PK2 ist. Es ist also ausreichend, 24 nt im 3' Bereich von PK1 zu entfernen, um die Aktivität des Reporter-genkonstrukts zu maximieren.

Auch dieses Experiment wurde in HeLa und StaEt1 Zellen durchgeführt. Wie erwartet zeigten diese Reporter-genkonstrukte ebenfalls eine unterschiedlich starke Promotoraktivität in beiden Zelllinien (Daten nicht gezeigt, vgl. Abb. 2.12). Zwischen den Konstrukten PK1 und PK1A/PK1B ist die Repression der Transkription nicht mehr vollständig, die maximale Promotoraktivität wird aber erst bei PK1C erreicht. Dieses Konstrukt zeigt in Abb. 2.12 einen abrupten Anstieg der Promotoraktivität. PK1C ist im Gegensatz zu PK1 am 3' Ende um 24 nt kürzer. Dieser 24 nt Bereich wird im folgenden als S24 Bereich bezeichnet.

Durch die Existenz dieses S24 Bereichs, konnte mit den Experimenten der ursprünglich für die Analyse des Promotors von Brn-3a(k) generierten Konstrukte PK1-PK7 (Abb. 2.9 & Abb. 2.10) keine Aussage über den Promotor des kurzen Brn-3a Gens gemacht werden.

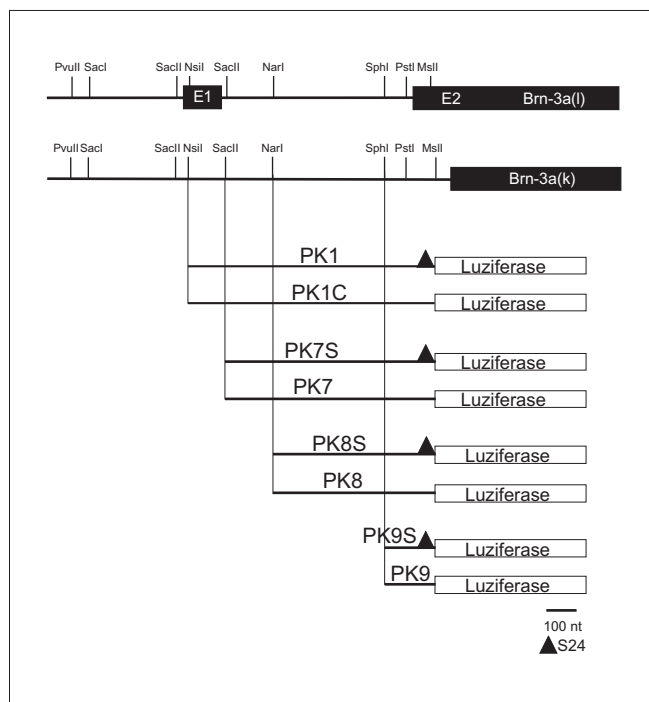


Abb. 2.13 Reporterergenkonstrukte mit und ohne S24 und 5' Deletionen zur Analyse der Brn-3a(k) Promotorregion

Die 3' Enden aller Reporterergenkonstrukte in dieser Abbildung wurden über PCR basierte Verfahren generiert und sequenziert. Die Konstrukte, die den S24 Bereich beinhalten sind mit einem schwarzen Dreieck gekennzeichnet. Zur Unterscheidung von Konstrukten, die diese Sequenz nicht enthalten, wurde bei diesen Plasmiden zur Unterscheidung ein S an das Ende des Konstruktnamens angehängt.

Um zu überprüfen, ob es neben S24 noch weitere Elemente in diesem Promotorbereich gibt, die für dessen Wirkung von Bedeutung sind, und um den Promotor generell genauer charakterisieren zu können, wurden weitere Reporterergenkonstrukte hergestellt.

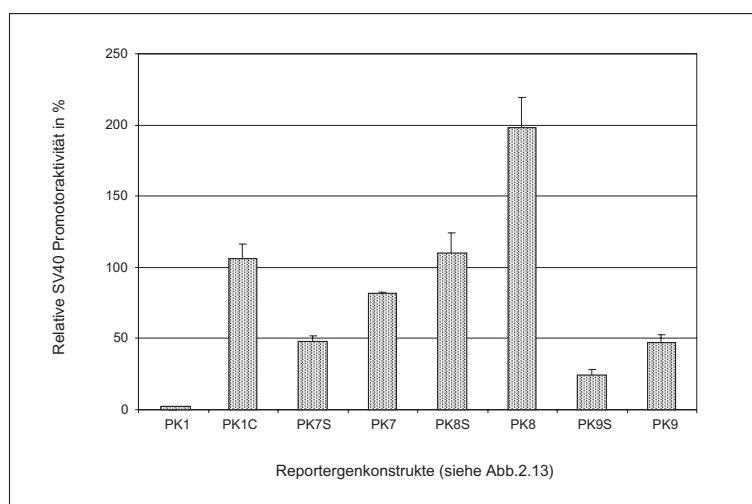


Abb. 2.14 Reporterergenaktivität von Konstrukten zur Brn-3a(k) Analyse

Die in Abb. 2.13 gezeigten Konstrukte wurden wie bereits beschrieben in die Tumorzelllinie StaEt1 transfiziert. Alle mit S gekennzeichneten Reporterergenkonstrukte enthalten den S24 Bereich. Entfernen der 5' gelegenen Sequenzen von PK1C zu PK7 verringert kaum die Reporterergenaktivität der Konstrukte ohne S24. Die entsprechenden Plasmide mit S24 (PK1 und PK7S) unterscheiden sich sehr stark in ihrer Promotoraktivität, bei Verkürzung des 5' Bereichs ist eine effiziente Hemmung der Reporterergenaktivität nicht mehr möglich.

Die Konstrukte PK1 (entspricht nach der ansonsten verwendeten Nomenklatur PK1S) und PK1C zeigen den bereits beschriebenen Effekt des S24 Bereichs. Interessant ist es, diese beiden Konstrukte mit den nächst kürzeren Reporterergenkonstrukten zu vergleichen. Von PK1C nach PK7 werden am 5' Ende 101 nt deletiert. Beide Konstrukte zeigen ähnliche

Reportergenaktivitäten. Vergleicht man jedoch die entsprechenden Konstrukte mit S24, PK1 und PK7S, wird deutlich, daß S24 nur in Gegenwart von 101 nt am 5' Ende seine repressorische Funktion ausüben kann, ansonsten kommt es statt einer vollständigen Inhibition der Transkription nur zu einer 50 %igen Repression der Reportergenaktivität. Bei allen weiteren Konstruktpaaren in dieser Abbildung ist der gleiche Effekt zu sehen. Die 101 nt lange Sequenz, die größtenteils im Exon 1 von Brn-3a(l) liegt, scheint aber selbst nicht in der Lage zu sein, die Transkription zu inhibieren, da PK1C und PK7 fast die gleiche Aktivität zeigen. Zwischen PK7 und PK8 führt das Fehlen von weiteren 181 nt zu einem zweifachen Anstieg der Reportergenaktivität. Weitere Deletion um 360 nt führt zu einer Abnahme der Transkriptionsrate. Abschließend ist festzustellen, daß die Transkription von Brn-3a(k) sehr stark von S24 abhängig ist, daher wurde dieser Bereich im folgenden genauer untersucht.

2.4. Charakterisierung von S24

Bei diesem 24 nt Fragment handelt es sich um ein DNA-Fragment, das offensichtlich die Promotoraktivität von Brn-3a(k) reguliert (siehe Abb. 2.10, Abb. 2.12 & Abb. 2.14). Eine Computer und Datenbank gestützte Analyse zeigte, daß eine DNA-Zielsequenz bekannter Transkriptionsfaktoren in S24 nicht enthalten ist.

2.4.1. Proteinbindung an S24

Um herauszufinden, ob ein Protein an S24 bindet, wurden EMSA Experimente (electromobility shift assays) durchgeführt. Für die Bindung eines DNA bindenden Proteins an seine Erkennungssequenz spielt die Salzkonzentration eine große Rolle, deshalb wurden verschiedene Puffer getestet. Da die Dissoziationskonstante eines DNA/Protein-Komplexes temperaturabhängig ist, wurde das folgende Experiment bei Raumtemperatur durchgeführt, um unspezifische Bindungen von Proteinen an die DNA zu verhindern.

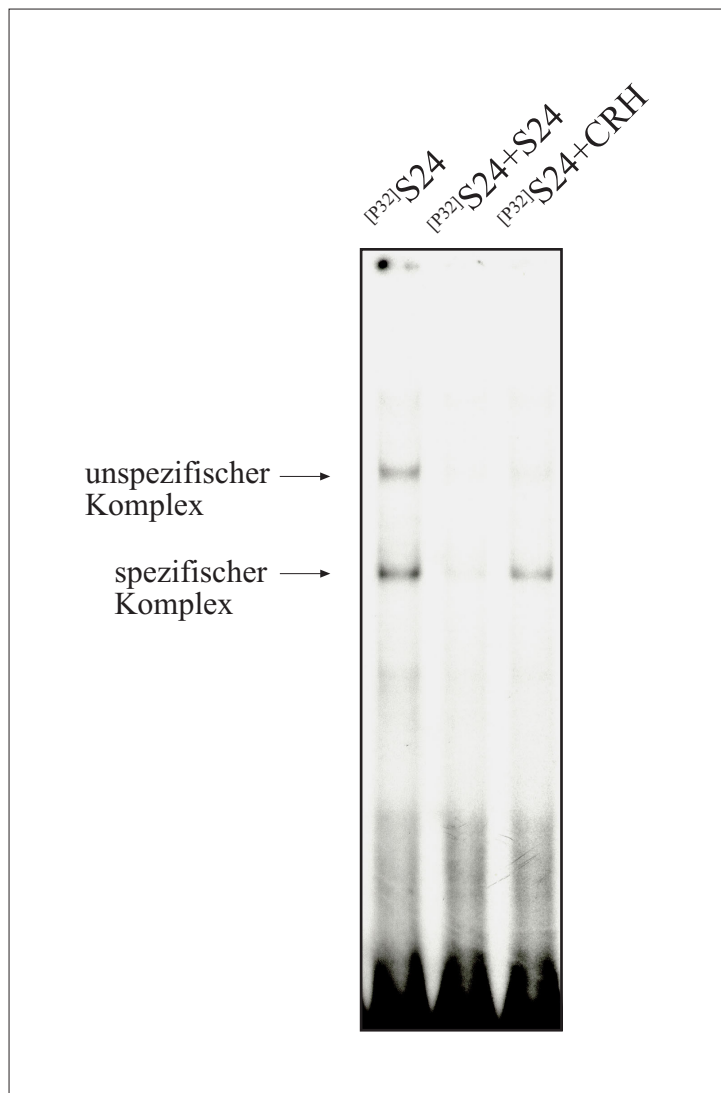


Abb. 2.15 Proteinbindung von S24

Kernextrakte von HeLa Zellen wurden verwendet, um die Bindung von S24 an Proteine zu überprüfen. Zur Detektion wurde ein dsOligodesoxynukleotid, das den S24 Bereich überspannt, radioaktiv markiert. DNA/Protein Komplexe wurden in einem nativen Polyacrylamidgel aufgetrennt und durch Exposition eines Röntgenfilms sichtbar gemacht. Die erste Spur zeigt einen Reaktionsansatz, der nur Kernextrakt und das radioaktiv markierte dsOligodesoxynukleotid S24 enthält. Die Spuren zwei und drei sind Kontrollen. Bei hundertfachem Überschuss des nicht radioaktiv markierten Oligodesoxynukleotids S24 wird keiner der beiden Komplexe gebildet. Bei Zugabe eines anderen, nicht radioaktiv markierten dsOligodesoxynukleotids (CRH), wird nur die Bildung des oberen Protein/S24 Komplexes inhibiert.

Für dieses Experiment wurden die beiden komplementären Oligodesoxynukleotide 24 Bgl-T und 24 Bgl-B denaturiert und langsam abgekühlt, wobei die einzelsträngigen Oligodesoxynukleotide ein dsOligodesoxynukleotid bildeten. Die jeweils überstehenden Enden wurden zur radioaktiven Markierung des dsOligodesoxynukleotids verwendet. Da die reprimierende Wirkung von S24 auch in HeLa Zellen gezeigt werden konnte (siehe Abb. 2.10, Daten nicht gezeigt), wurde diese Zelllinie zur Präparation von Kernextrakten verwendet, das gleiche Experiment wurde mit StaEt1 Zellen durchgeführt (Daten nicht gezeigt).

Abb. 2.15 zeigt die Bindung des S24 überspannenden, markierten dsOligodesoxynukleotids an Proteine von HeLa-Kernextrakten. Die erste Spur zeigt zwei DNA/Protein Komplexe. Da es sich bei diesen Komplexen auch um unspezifische Protein/DNA-Komplexe handeln

könnte, wurden Kontrollen mit einem Überschuß an nicht radioaktiv markiertem Doppelstrangoligodesoxynukleotid durchgeführt. Bei der Probe in der mittleren Spur wurde dem Reaktionsansatz ein hundertfacher Überschuß des nicht radioaktiv markierten S24 dsOligodesoxynukleotids zugegeben. Beide Komplexe, sowohl der langsam als auch der schnell wandernde sind wegen des Überschusses an nicht radioaktiv markiertem Oligodesoxynukleotid auf dem Röntgenfilm nicht sichtbar.

Um zu zeigen, daß die Bindung eines Proteins an S24 spezifisch ist, wurde ein nicht radioaktiv markiertes dsOligodesoxynukleotid, das nicht die S24 Sequenz enthält, mit dem Namen CRH als Kompetitor eingesetzt. Die rechte Spur in Abb. 2.15 zeigt den entsprechenden Reaktionsansatz. Der DNA/Protein Komplex mit der geringeren Mobilität im elektrischen Feld verschwindet nach Zugabe von nicht radioaktivem, unspezifischem dsOligodesoxynukleotid. Dieser DNA/Protein Komplex beinhaltet also ein Protein, welches unspezifisch an dsDNA bindet. Der detektierbare Komplex in der dritten Spur hat eine vergleichbare Intensität wie der untere Komplex in der ersten Spur. Dieser Komplex beinhaltet also ein Protein, welches spezifisch an S24 bindet.

2.4.2. Wirkung von S24 auf heterologe Promotoren

Die Reporterexperimente in Abschnitt 2.3.2 zeigen, daß die Sequenz S24 bzw. die Faktoren, die an diese Sequenz binden können, unverzichtbar für die Regulation des kurzen Brn-3a Gens sind. Da die S24 Sequenz in den bisherigen Untersuchungen in ihrer natürlichen Umgebung vorlag und bereits ein 101 nt langes DNA Fragment identifiziert werden konnte, welches zur vollständigen Wirkung von S24 nötig ist, kann nicht ausgeschlossen werden, daß für die repressorische Wirkung von S24 noch weitere DNA-Sequenzen, z.B. zur Interaktion mit weiteren Repressorelementen, notwendig sind.

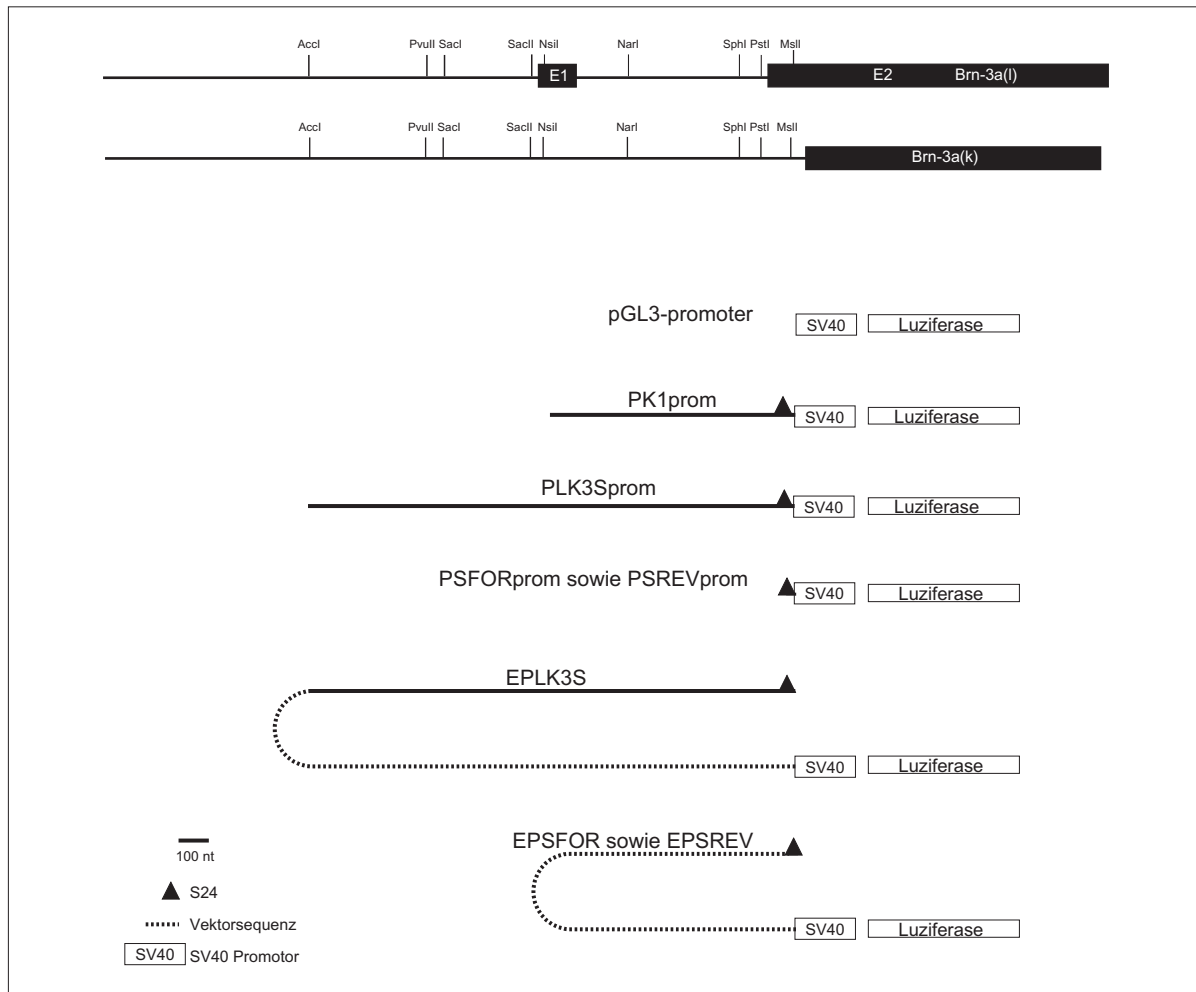


Abb. 2.16. Reporter-Genkonstrukte zur Untersuchung von S24

Abgebildet sind zwei Typen von Reporter-Genkonstrukten, solche, bei denen die zu untersuchende Sequenz direkt vor den SV40 Promotor liegt, und solche, bei denen sich die Sequenz weiter entfernt vom SV40 Promotor befindet. PLK3Sprom beinhaltet Sequenzen, die sowohl aus dem Promotor von Brn-3a(l) als auch aus dem von Brn-3a(k) stammen. Um einen Translationsstart am ATG von Brn-3a(l) zu verhindern, wurde dieses Startkodon (und zwei weitere ATGs in direkter Nachbarschaft) mit Hilfe von PCR zerstört. Das Konstrukt EPLK3S enthält die gleiche Sequenz in der Enhancer-Stelle im gleichen Vektor. PK1prom unterscheidet sich von PK1 nur dadurch, daß das erstere den SV40 Promotor enthält. PSFORprom enthält die S24 Sequenz direkt vor dem SV40 Promotor des pGL3prom Vektors, PSREVprom die gleiche Sequenz in der umgekehrten Orientierung. Die Konstrukte EPSFOR und EPSREV enthalten die S24 Sequenz in beiden Orientierungen in der Enhancer-Region des pGL3prom Vektors.

Um zu untersuchen, ob S24 ausreichend für die Repression des Brn-3a(k) Promotors ist bzw. ob es auch auf andere Promotoren wirkt, wurde das S24-Fragment in den Vektor pGL3prom inseriert, welches den SV40 Promotor enthält. Dieser virale Promotor beeinflußt die Funktion von S24 *in vivo* auf keinen Fall. Die beiden Oligodesoxynukleotide 24-Bgl-T (bzw. 24-Bgl-B) und 24-Xho-B (bzw. 24-Xho-T) wurden kinasiert, hybridisiert und in die Enhancer-Stelle des pGL3prom Vektors inseriert. Die Konstrukte (S24 in beiden Orientierungen) wurden mit EPSFOR und EPSREV bezeichnet. Das S24-Fragment wurde in beiden Orientierungen direkt

vor dem SV40 Promotor in den pGL3prom Vektor inseriert, die resultierenden Konstrukte wurden mit PSFORprom und PSREVprom bezeichnet. Zusätzlich wurde das DNA-Fragment aus PK1, welches die S24 Sequenz enthält, vor dem SV40 Promotor inseriert (PK1prom). Ebenfalls vor diesen Promotor inseriert wurde die Sequenz, die sowohl den Promotor von Brn-3a(l) als auch den von Brn-3a(k) enthält (PLK3prom). Um Translationsinitiation am Startkodon von Brn-3a(l) zu verhindern, wurden das Startkodon von Brn-3a(l) und zwei weiter stromabwärts liegende ATG Kodons mit Hilfe von PCR amplifizierten Fragmenten deletiert. Dazu wurde eine Zweistufen-PCR durchgeführt. In der ersten Reaktion wurden der 5' Bereich des Brn-3a(l) Gens einschließlich des Translationsinitiationskodons und der beiden anderen ATG Triplets mit Hilfe der Oligodesoxynukleotide -500-Kpn und ATG-del-B amplifiziert. Dabei trug das Oligodesoxynukleotid ATG-del-B entsprechende Nukleotidaustausche um die ATG Triplets zu mutieren. In einem zweiten Reaktionsansatz wurde mit den Oligodesoxynukleotiden ATG-del-T und +7275-Xba bzw. +7299-Xba der stromabwärts des Startkodons von Brn-3a liegende Teil des zu generierenden Konstruktes amplifiziert. In der zweiten Stufe der PCR dienten die beiden PCR-Produkte der ersten Stufe als Matrize, Oligodesoxynukleotide für die PCR waren -500-Kpn und +7275-Xba bzw. +7299-Xba. Die gleiche Sequenz, die für PLK3Sprom Verwendung fand, wurde noch in die Enhancer-Stelle des pGL3prom Vektors inseriert, um zu testen, welchen Einfluß die Position von S24 auf die Transkription hat. Die Konstrukte wurden in StaEt1 Zellen transfiziert, und die Reporterogenaktivität gemessen.

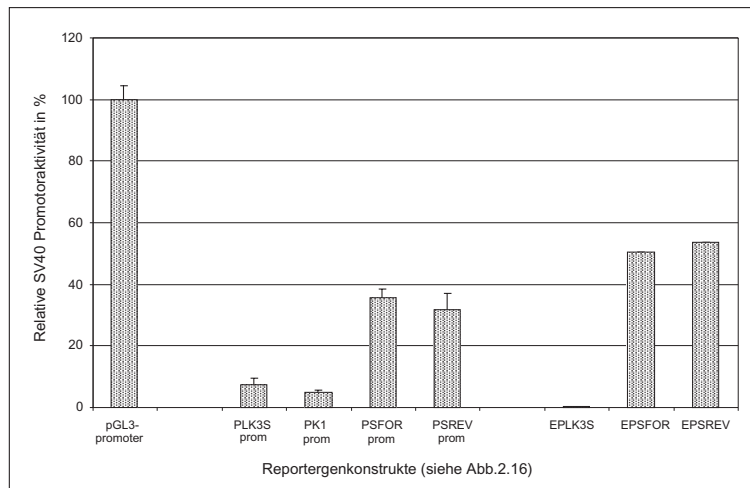


Abb. 2.17 Promotoraktivität von Konstrukten mit unterschiedlicher S24 Position

Alle Konstrukte in dieser Abbildung sind vom pGL3prom Vektor abgeleitet, sie enthalten den S24 Bereich (Abb. 2.16). Die Reporter-genkonstrukte wurden in StaEt1 Zellen transfiziert. Nach 28 Stunden wurden Proteinextrakte hergestellt. In den Extrakten wurde die Luziferaseaktivität gemessen und über die des SV40 Promotors normiert. Die Anwesenheit von S24 im Konstrukt übt einen starken Einfluß auf die Promotoraktivität des SV40 Promotors aus. Die Konstrukte, die neben S24 noch weitere

Sequenzen aus dem Promotor von Brn-3a(k) enthalten, zeigen eine Repression der Promotoraktivität von über 90 % im Vergleich zum Leervektor. Befindet sich nur S24 im pGL3prom Vektor, ist der Effekt nicht so ausgeprägt wie bei den Konstrukten, die noch zusätzliche Sequenzen aus dem Brn-3a(k) Promotor enthalten.

Das Einbringen der 24 nt langen Sequenz S24 ist ausreichend, um den heterologen SV40 Promotor zu reprimieren. Die Promotoraktivität sinkt unabhängig von der Orientierung des S24-Elements auf ca. 50 % des pGL3prom Ausgangsplasmids ab, wenn S24 in die Enhancer-Stelle des pGL3prom Vektors eingesetzt wurde (EPSFOR und EPSREV). Liegt S24 direkt vor dem SV40 Promotor, sinkt die Promotoraktivität auf etwa 35 % des Ausgangswertes ab (PSFORprom und PSREVprom). Das Einbringen von S24 im Zusammenhang mit der 5' davon gelegenen Sequenz des Brn-3a(k) Gens vor den SV40 Promotor führt zu einer Verringerung der SV40 Promotoraktivität um über 90 %. Eine noch drastischere Repression der SV40 Promotoraktivität wird erreicht, wenn neben der S24 Sequenz noch weiter stromaufwärts gelegene Sequenzen im Konstrukt vorhanden sind (EPLK3prom). Diese Experimente zeigen, daß S24 nicht nur im endogenen Kontext ein Repressor der Transkription ist, sondern auch auf einen heterologen Promotor wie den SV40 Promotor wirken kann. Eine fast vollständige Repression wird jedoch nur dann erreicht, wenn neben S24 weitere Sequenzen aus dem Promotorbereich von Brn-3a(k) vorhanden sind.

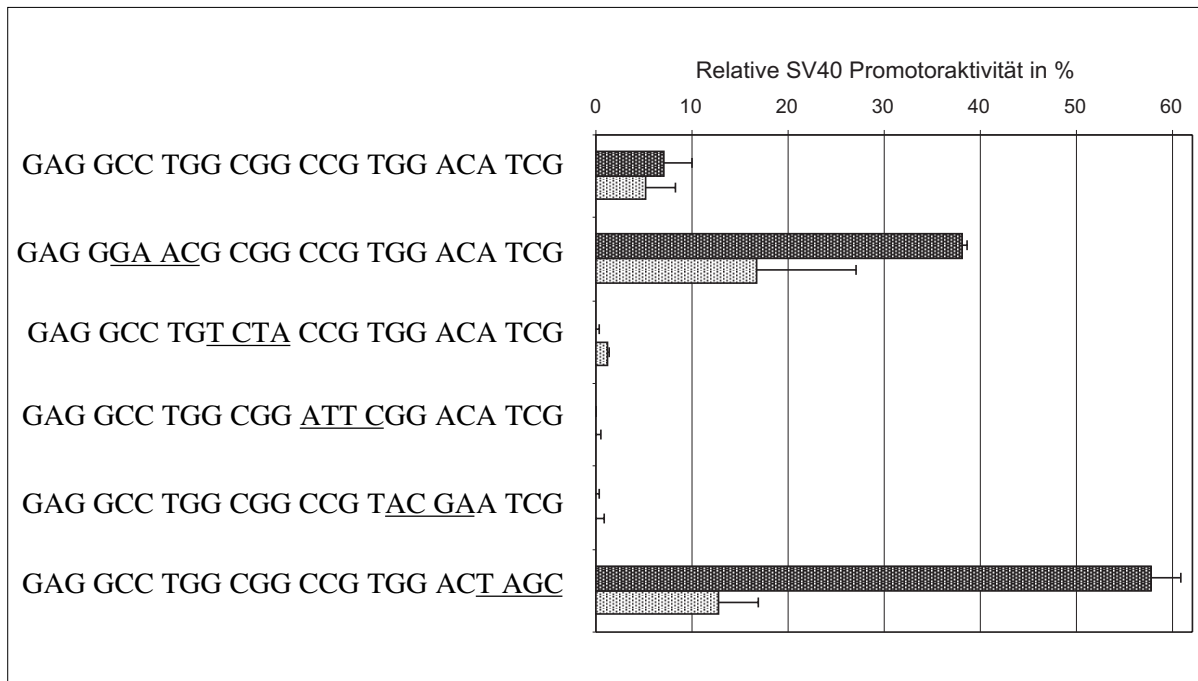


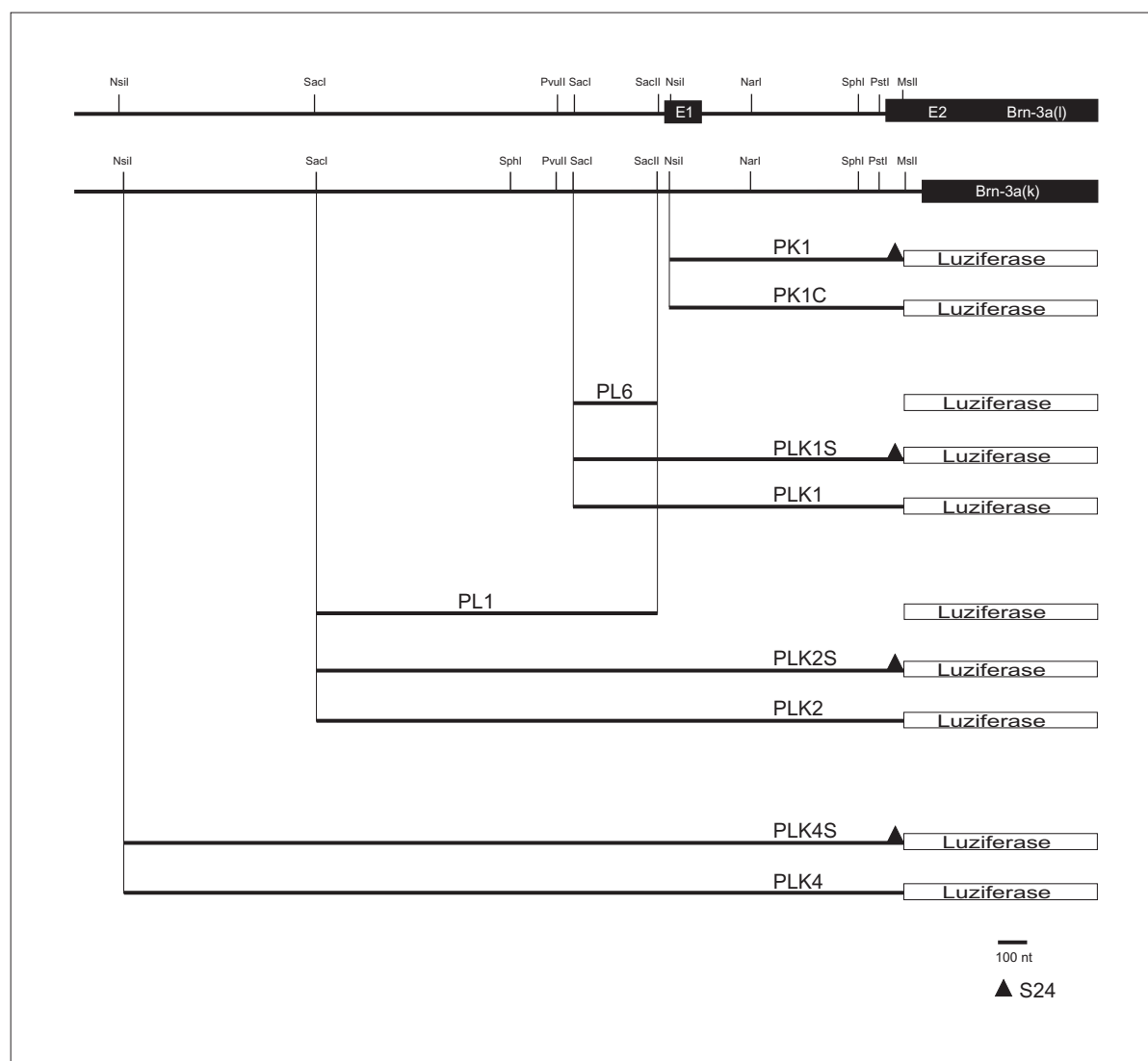
Abb. 2.18 Luziferaseaktivität von Reportergenkonstrukten mit Mutationen innerhalb von S24

Über PCR Verfahren wurden Konstrukte generiert, die dem Plasmid PK1 entsprechen, mit dem Unterschied, daß über die Primer der PCR Mutationen in S24 eingeführt wurden. Bei der Wahl der Nukleotidsequenz für die mutierten Bereiche wurde darauf geachtet, daß durch den Austausch der Nukleotide keine neuen Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren generiert wurden. Gezeigt sind Reportergenaktivitäten von Experimenten in StaEt1 (dunkle Balken) und ND7 Zellen (helle Balken). Es gibt zwei Konstrukte, bei denen die eingeführten Mutationen zum Verlust der repressorischen Wirkung von S24 führt, die entsprechenden Nukleotide in Wildtyp S24 sind also essentiell für die Funktion des S24 Bereichs.

Mutationen im S24 Bereich sollten dessen reprimierende Wirkung auf die Reportergenaktivität der transfizierten Konstrukte aufheben. In dieser Versuchsreihe mit Konstrukten, die sich von PK1 ableiten gibt es zwei Konstrukte, die eine relative SV40 Reporter-genaktivität von 39 % bzw. 58 % erreichen, das bedeutet, daß durch die Mutationen in diesen Konstrukten die repressorische Wirkung von S24 aufgehoben werden konnte. Eine Konsensussequenz aus S24, die die repressorische Aktivität vermitteln kann, könnte also NNN NCC TGN NNN NNN NNN NNA TCG lauten.

2.4.3. S24 im Kontext von Brn-3a(l) und Brn-3a(k)

Da S24 einen Einfluß auf die Aktivität von Promotoren ausüben kann, die nicht in direkter Umgebung von S24 liegen, stellte sich die Frage nach dem Einfluß von S24 auf den Promotor von Brn-3a(l). Zur Untersuchung diesen Aspekts wurden Konstrukte generiert, die beide



Dargestellt sind die Konstrukte, die aus der Promotorregion von Brn-3a(l) und Brn-3a(k) stammen. Im Vergleich dazu wurden die bereits beschriebenen Konstrukte aus dem Brn-3a(l) Promotor eingezeichnet. Die 3' Enden der Konstrukte entsprechen jeweils PK1 bzw. PK1C. Zur Vermeidung von Translationsinitiation am Start-ATG von Brn3a(l) wurde dieses Startkodon und zwei weitere stromabwärts liegende ATG Triplets über PCR Verfahren mutiert.

Die Reporter-genkonstrukte wurden sowohl in StaEt1 als auch in HeLa Zellen transfiziert. Die Reporter-genaktivität der Plasmide war in beiden Tumorzelllinien etwa gleich groß (Daten nicht gezeigt). Dies spricht dafür, daß die gemessene Luziferaseaktivität ausschließlich vom Promotor von Brn-3a(l) stammt, da der Promotor von Brn3a(k) in der humanen Zervixkarzinomzelllinie nicht aktiv ist (siehe Abb. 2.10)

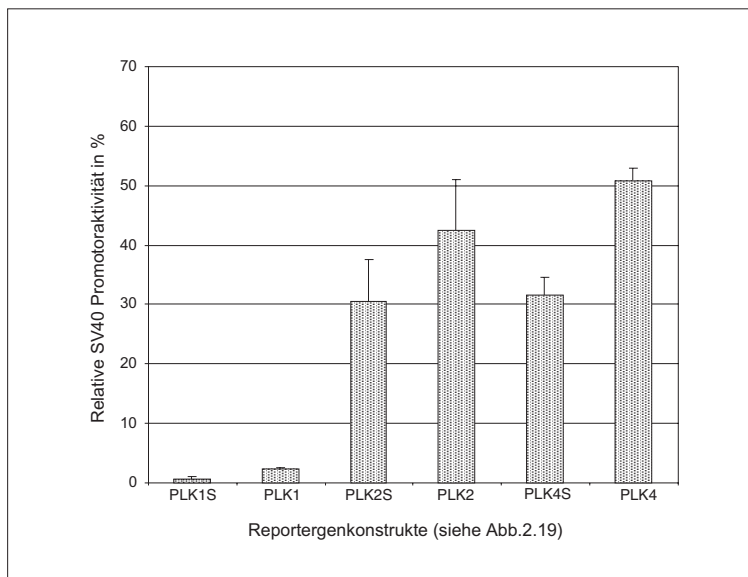


Abb. 2.20 Luziferaseaktivität von Reporter-genkonstrukten, die regulative Sequenzen der 5' Bereiche von Brn-3a(l) und Brn-3a(k) beinhalten

6 µg der in Abb. 2.19 abgebildeten Reporter-genkonstrukte wurden in die neuronale Tumorzelllinie StaEt1 transfiziert. Nach 28 Stunden wurden die Zellen geerntet. Die Aktivität des Reportergens Luziferase wurde luminometrisch bestimmt. Die Konstrukte PLK1 und PLK1S enden an der gleichen Stelle im 5' Bereich von Brn-3a(l) wie das Konstrukt PL6 und zeigen auch eine vergleichbare Luziferaseaktivität (vgl. Abb. 2.8). PLK2 und PLK2S hatten das gleiche 5' Ende wie PL1, die Promotoraktivität war jedoch geringer. Längere Konstrukte zeigten keine weitere Änderung der Luziferaseaktivität.

Diese Abbildung zeigt die Reporter-genaktivität der Konstrukte aus Abb. 2.19 nach Transfektion in StaEt1 Zellen. Bei allen Konstrukten ist keine additive Promotoraktivität von Brn-3a(k) und Brn-3a(l) zu sehen, unabhängig davon, ob die Reporter-genkonstrukte S24 enthalten oder nicht. Die Konstrukte PLK1 und PLK1S legen nahe, daß der Promotor von Brn-3a(k) nicht aktiv ist, wenn Regionen aus dem 5' Bereich von Brn-3a(l) im Konstrukt vorhanden sind. Im Kontext mit Sequenzen aus dem Brn-3a(l) Promotor spielt S24 keine große Rolle, obwohl die für die starke Funktion von S24 nötige 101 nt lange Sequenz in allen Reporter-genkonstrukten aus Abb. 2.20 vorhanden ist.

2.5. Effektorgene von Brn-3a

Wenn man Effektorgene mit Hilfe von stabilen Zelllinien untersucht, benötigt man immer eine Zelllinie, die das entsprechende Gen exprimiert und eine, die keine nachweisbare Expression aufweist, um Unterschiede, die durch die Expression des zu untersuchenden Gens verursacht werden, detektieren zu können. Konstitutiv exprimierende, stabile Zelllinien haben den Nachteil, daß zwei Zellklone (Leervektor und Expressionskonstrukt) miteinander verglichen werden müssen. Dabei können Effekte, die durch die Integration der Expressionskassette ins Genom hervorgerufen werden, nicht ausgeschlossen werden. So kann es z.B. zu erhöhter oder erniedrigter Expression von Proteinen kommen, deren Gene am Ort der Integration liegen. Ein Expressionssystem, das diese Nachteile nicht hat, ist ein induzierbares Zellsystem, da dieselbe Zelllinie als Negativkontrolle eingesetzt werden kann, wenn keine Protein Expression induziert wurde.

2.5.1. Induzierbare Brn-3a(l) Zelllinien

Zur Herstellung von Brn-3a induzierbaren Zelllinien wurde das RevTet-Off™ System der Firma Clontech verwendet. Bei diesem System wird durch Entzug von Doxycyclin die Expression des zu untersuchenden Gens induziert. Das System besteht aus zwei Vektoren. Der pRevTet-Off Vektor enthält die Sequenz eines Tetracyclin bzw. Doxycyclin abhängigen Transaktivators (tTA), dessen Transkription durch einen CMV-Promotor aktiviert wird. Der Expressionsvektor pRev-TRE enthält neben einem CMV-Minimalpromotor ein TRE ('Tetracyclin responsive Element'). In Anwesenheit von Doxycyclin kann tTA nicht an das TRE in der Promotorregion des Expressionskonstrukts binden. In Abwesenheit von Doxycyclin bindet der Transaktivator an seine Erkennungssequenz und aktiviert die Expression des Gens im Expressionsvektor (Gossen und Bujard, 1992). Das pRevTet-Off Konstrukt vermittelt Geneticin-Resistenz, pRev-TRE HygromycinB-Resistenz.

2.5.1.1. Herstellung von Brn-3a exprimierenden induzierbaren Zelllinien

Die murine cDNA von Brn-3a(l) wurde in den pRev-TRE Vektor inseriert. Das verwendete System ist dazu gedacht, Viruspartikel herzustellen und die DNA des Regulations- und des Expressionskonstrukts durch Infektion in die Zielzelle einzuschleusen. Es konnten auf diesem Wege keine Brn-3a exprimierenden NIH3T3 Zelllinien erzeugt werden. Da das RevTet-OffTM System jedoch in transienten Transfektionen sehr hohe regulierbare Expression von Brn-3a zeigte, wurden stabile Zelllinien auf herkömmlichem Wege etabliert. Dazu wurden je 20 µg der pRevTET-Off und pRev-Brn-3a Vektoren mit *PvuI* bzw. *SspI* linearisiert, gefällt, in je 20 µl PBS resuspendiert und vereinigt. NIH3T3 Zellen wurden mit diesem DNA Mix durch Elektroporation (siehe Abschnitt 4.12.7) transfiziert. Direkt nach der Transfektion wurde dem Kulturmedium 10 ng/ml Doxycyclin zugesetzt. Nach 18 Stunden wurde die Selektion gestartet, indem das Kulturmedium neben Doxycyclin zusätzlich mit 500 µg/ml Geneticin und 250 µg/ml Hygromycin B versetzt wurde. Nach 10 Tagen konnten einzelne Zellklone isoliert werden. Diese wurden expandiert und auf induzierbare Expression von Brn-3a in Immunblots analysiert.

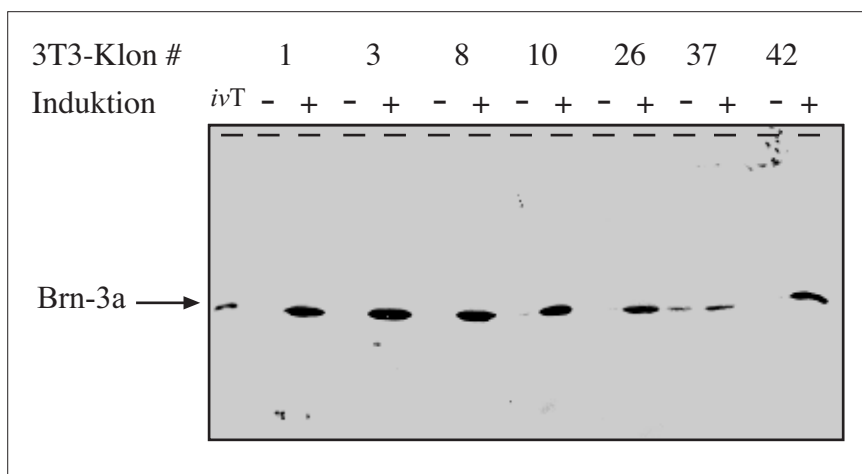


Abb. 2.21 Nachweis der induzierten Expression von Brn-3a in stabil transfizierten Zelllinien

Es wurde jeweils in zwei Vertiefungen einer 6-Loch-Platte die gleich Zellzahl eines NIH3T3-Klons in Doxycyclin haltigem Kulturmedium ausgesät. Nach 24 Stunden wurde das Medium einer Vertiefung gegen Kulturmedium ohne Doxycyclin ausgetauscht. Nach weiteren 24 Stunden wurden die Zellen geerntet

und mit 100 µl WCE-Puffer versetzt. Auf ein Polyacrylamidgel wurden je 30 µl Ganzzellextrakt der oben angegebenen stabilen NIH3T3 Zelllinien aufgetragen, durch Gelelektrophorese aufgetrennt und auf eine Membran transferiert. In der ersten Spur wurde das *in vitro* Translatat von Brn-3a(l) als Positivkontrolle aufgetragen (*ivT*). Als Erstantikörper wurde ein monoklonaler Anti-Brn-3a Mausantikörper verwendet. Die Detektion erfolgte über einen Peroxidase gekoppelten Zweitantikörper mit anschließender ECL-Reaktion und Belichtung eines Röntgenfilms.

Abb. 2.21 zeigt einen typischen Westernblot von analysierten Klonen. Es gab einige stabile Zelllinien, deren Brn-3a Expression nicht regulierbar war, aber nur sehr wenige Zellklone, die

keinerlei Brn-3a Expression zeigten. Die Expression von Brn-3a war sehr hoch im Vergleich zu der in den Zelllinien StaEt1, Sal2 und RDES (Daten nicht gezeigt).

2.5.1.2. Charakterisierung der induzierbaren Zelllinien

Die Zelllinien, bei denen die Expression von Brn-3a induziert werden konnte, wurden expandiert und erneut auf induzierbare Expression getestet. Da beim RevTet-OffTM System durch Entfernen von Doxycyclin Proteinexpression induziert wird, mußte die minimale Doxycyclinkonzentration ermittelt werden, bei der die Expression von Brn-3a gerade noch reprimiert ist, um nach Induktion möglichst schnell Proteinexpression zu erhalten.

Hierfür wurde eine Konzentrationsreihe von Doxycyclin in Kulturmedium angesetzt und die Zellen 48 Stunden mit dem Medium inkubiert. Anschließend wurden Proteinextrakte hergestellt, und die Proteinmenge von Brn-3a im Westernblot nachgewiesen. Bereits bei 1 ng/ml Doxycyclin im Kulturmedium war die Expression von Brn-3a fast vollständig reprimiert (Abb. 2.21). Im folgenden wurden für alle Experimente jeweils 2 ng/ml Doxycyclin eingesetzt. Hohe Konzentrationen von Doxycyclin (10 µg/ml) üben einen inhibitorischen Effekt auf den Zellzyklus aus (Daten nicht gezeigt). Dies konnte anhand des langsameren Wachstums der Zellen gegenüber Wildtyp NIH3T3 Zellen oder induzierten Zelllinien mit Kontrollproteinen (GFP, 'green fluorescent protein') beobachtet werden. Die geringe Dosis von 2 ng/ml Doxycyclin übt diesen Effekt nicht aus.

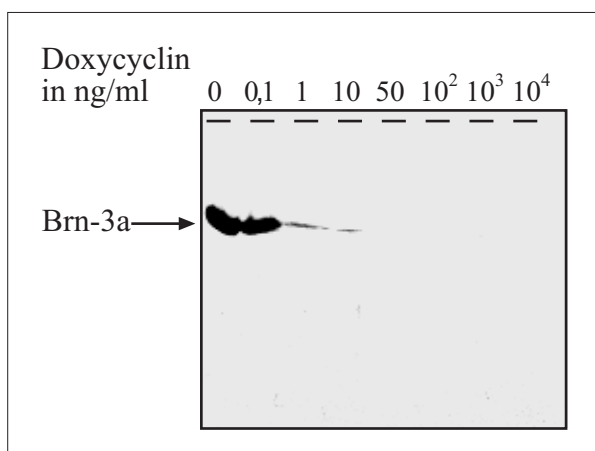


Abb. 2.22 Verdünnungsreihe von Doxycyclin

Zellen der stabilen Zelllinie NIH3T3-3a-10 wurden mit PBS gewaschen, mit Medium und den angegebenen Doxycyclinkonzentrationen versetzt und nach 48 Stunden geerntet. Ganzzelextrakte davon wurden im Immunblot Verfahren analysiert. Als Erstantikörper wurde ein monoklonaler Antikörper gegen Brn-3a verwendet. Die Detektion erfolgte über einen Peroxidase gekoppelten Zweitantikörper mit anschließender ECL-Reaktion und Belichtung eines Röntgenfilms.

Nachdem die minimale Doxycyclinkonzentration bekannt war, konnte eine Kinetik der Proteinexpression erstellt werden. Eine genaue Kenntnis des Expressionsbeginns von Brn-3a in den untersuchten Zellen war nötig, da bei nachfolgenden Experimenten die primären Effekte untersucht werden sollten, die durch die Expression von Brn-3a vermittelt werden. Für die Kinetik wurden die Zellen in 6-Lochplatten in Gegenwart von Doxycyclin ausgesät. Zu bestimmten Zeiten wurde das Medium je einer Vertiefung gegen Kulturmedium ohne Doxycyclin ausgetauscht und damit die Proteinexpression induziert. Alle Zellen wurden zur gleichen Zeit geerntet. Abb. 2.23 zeigt eine Analyse von Proteinextrakten, aus zu verschiedenen Zeitpunkten induzierten Zellen, angegeben ist die Induktionsdauer.

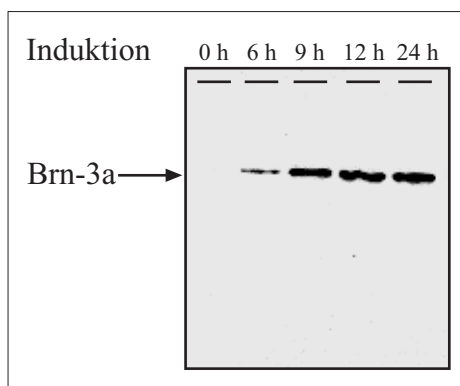


Abb. 2.23 Kinetik der Brn-3a Expression in stabilen Zelllinien

Die Zellen der Linie NIH3T3-10 wurden mit 2 ng/ml Doxycyclin kultiviert. Zu den angegebenen Zeiten wurde das Kulturmedium gegen Doxycyclin freies Medium ausgetauscht. Die Zellen wurden zum gleichen Zeitpunkt geerntet. Ganzzelextrakte wurden hergestellt und je 50 µg Proteinextrakt auf Brn-3a Expression hin untersucht. Die Detektion erfolgte über einen monoklonalen Anti-Brn-3a Antikörper und einen Peroxidase gekoppelten Zweitantikörper mit anschließender ECL-Reaktion und Belichtung eines Röntgenfilms.

Die obige Abbildung zeigt die Expression von Brn-3a(l) nach Doxycyclin Entzug. Expression von Brn-3a konnte frühestens 6 Stunden nach Induktion nachgewiesen werden. Frühere Meßpunkte zeigten keine Expression (Daten nicht gezeigt).

Das Brn-3a Protein induziert die Expression von Bcl2 (Smith, *et al.*, 1998). Da das Protoonkogen Bcl2 eine antiapoptotische Wirkung hat, ist bei Überexpression von Brn-3a, gefolgt von Überexpression von Bcl2, eher eine verringerte Anzahl von apoptotischen Zellen zu erwarten. Um diesem Hinweis nachzugehen wurden Brn-3a exprimierende Zellen und die entsprechenden Kontrollen mit Propidiumiodid angefärbt und die Zellzyklusverteilung durchflußzytometrisch bestimmt. Es zeigte sich keine Veränderung im Zellzyklus durch die Expression von Brn-3a. Um auszuschließen, daß der Grund hierfür in der zu geringen Menge Brn-3a exprimierender Zellen liegt, wurde pRev-Brn-3a mit pRev-TET-Off und einem Spektrin-GFP Fusionsprotein Expressionsvektor in ND7 Zellen kotransfiziert. In der Regel

nehmen Zellen bei einer Kotransfektion immer beide Konstrukte auf. Nur die GFP exprimierenden Zellen wurden im Hinblick auf ihre Zellzyklusverteilung untersucht.

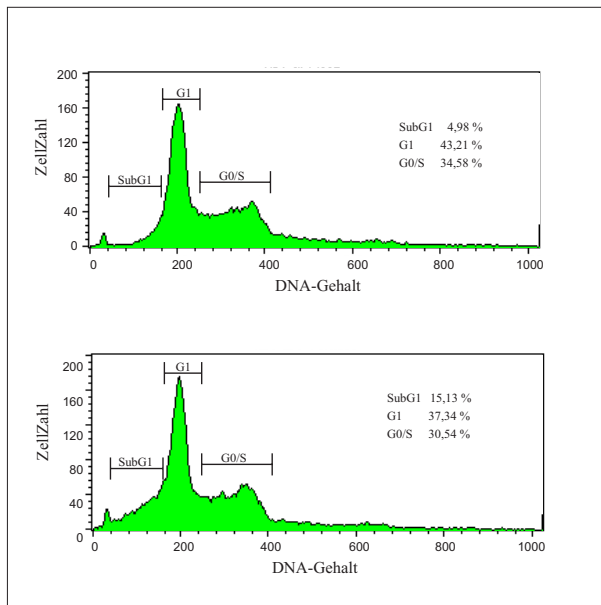


Abb. 2.24 Durchflußzytometrische Untersuchung der Zellzyklusverteilung von Brn-3a überexprimierenden Zellen

ND7 Zellen wurden mit den Konstrukten des pREV-TET-Off Systems und einem Markergenkonstrukt transfiziert. Die Brn-3a Expression wurde in einem Teil der Zellen induziert. Nach Aufarbeitung der Zellen wurden diese mit Propidiumiodid gefärbt und durchflußzytometrisch analysiert. Hierfür wurde die Zellzyklusverteilung der GFP positiven Zellen gemessen. Auf der Ordinate ist die Fluoreszenz der Zellen - und damit der DNA-Gehalt - aufgetragen, auf der Abzisse ist die Anzahl der Zellen dargestellt. Zur Auswertung wurde der Prozentsatz der Zellen in den verschiedenen Stadien des Zellzyklus bestimmt. Der mit SubG1 bezeichnete Bereich besteht aus den Zellen, deren DNA-Gehalt geringer als der einer normalen Zelle ist, also apoptotischen Zellen. G1 bezeichnet ruhende Zellen, G0/S steht für Zellen, die sich in der Synthesephase befinden.

Der markanteste Unterschied zwischen Brn-3a überexprimierenden und nicht induzierten Zellen ist, daß die Brn-3a überexprimierenden Zellen einen dreifach höheren Anteil an apoptotischen Zellen aufweisen, in Abb. 2.24 mit SubG1 bezeichnet. Da dieser Befund nicht mit den von Smith, *et al.*, publizierten Expressionsdaten über Bcl2 Induktion durch Brn-3a Expression übereinstimmt, wurde die Bcl2 Expression in Brn-3a überexprimierenden Zellen überprüft.

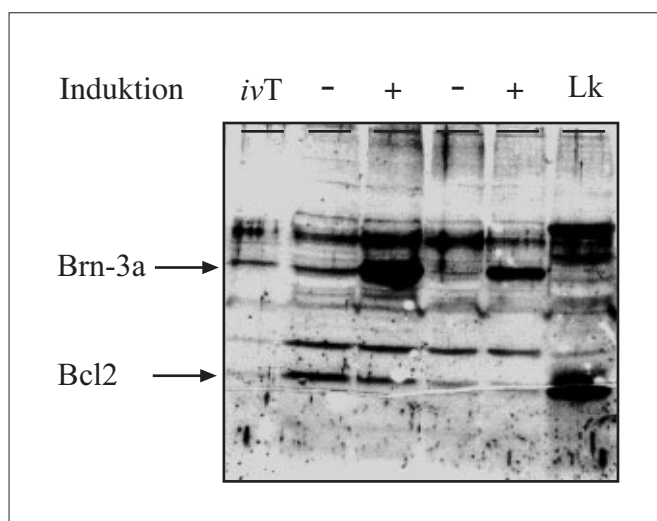


Abb. 2.25 Bcl2 Expression in Brn-3a überexprimierenden Zellen

Gezeigt ist die Analyse von Ganzzelextrakten von transfizierten ND7 Zellen. Der Elektroporationsansatz wurde direkt nach der Transfektion geteilt und in doxycyclinhaltiges bzw. -freies Kulturmedium überführt. Die Zellen wurden geerntet und je 50 µg des Proteinextrakts wurde pro Spur aufgetragen. Der Immunblot wurde sowohl mit dem monoklonalen Anti-Brn-3a Antikörper als auch mit einem polyklonalen Anti-Bcl2 Antikörper inkubiert. Als Positivkontrollen dienten ein *in vitro* Translatat von Brn-3a (ivT) und ein Proteinextrakt aus Lymphknoten für Bcl2 (LK). Als Zweitantikörper wurden ein Peroxidase gekoppelter Anti-Maus Antikörper und ein Peroxidase gekoppelter Anti-Kaninchen Anti-

körper verwendet, anschließend erfolgte die ECL-Reaktion und die Belichtung eines Röntgenfilms. Es sind unterschiedliche Transfektionsansätze der ND7 Zellen aufgetragen. Weder bei starker noch bei schwacher Brn-3a Expression ist eine Erhöhung des Bcl2 Niveaus zu sehen.

Bei den transfizierten Zellen konnte nach Doxycyclinentzug deutlich Brn-3a Protein nachgewiesen werden. Die Brn-3a exprimierenden Zellen zeigen jedoch im Gegensatz zu den publizierten Daten keine erhöhte Bcl2-Expression. Dieses Experiment wurde zusätzlich mit den stabilen, induzierbaren Zelllinien und Brn-3a transgenen Mäusen durchgeführt (Daten nicht gezeigt). In jedem Fall konnte Brn-3a Expression gezeigt werden, jedoch kein Unterschied in der Expression des Bcl2 Proteins.

2.5.2. DNA-Array-Analyse

Da weder die induzierbaren Brn-3a exprimierenden Zelllinien noch Brn-3a transgene Mäuse (Daten nicht gezeigt) einen Phänotyp zeigten, wurde eine DNA-Array-Analyse durchgeführt. Dazu wurde der NIH3T3-Klon #10 auf zwei 15 cm Schalen ausplattiert. Die Brn-3a Expression wurde in einer Schale induziert und nach 6 Stunden durch Zellyse mit anschließender RNA-Präparation (RNeasy-Kit, Fa. Qiagen) gestoppt. Die folgende DNA-Array-Analyse wurde von Dr. L. Klein-Hitpaß durchgeführt. Der erste Schritt der Herstellung der markierten RNA-Probe ist eine Erststrangsynthese. Diese Reaktion erfolgte unter Einsatz des Enzyms Superscript II (Life Technologies) und Verwendung eines T7-oligod(T)₂₄ Primers. Die Zweitstrangsynthese erfolgte unter Verwendung der Enzyme RNase H (TaKaRa), um die RNA partiell zu hydrolysieren, *E. coli* DNA-Polymerase I (Life Technologies) zum Auffüllen der partiell hydrolysierten RNA und *E. coli* DNA-Ligase (TaKaRa) zur Veresterung der kurzen, synthetisierten DNA-Fragmente. Zur Erzeugung von vollständigen Zweitstrangmolekülen wurde T4-DNA-Polymerase I (TaKaRa) zugesetzt. Die auf diese Weise hergestellten Moleküle enthielten am 3' Ende den T7-Promotor, der dem Enzym T7-Polymerase als Start zur cRNA Synthese diente. Zur Markierung der cRNA wurden Biotin gekoppelte dNTPs verwendet. Die Länge der so synthetisierten, biotinylierten cRNA betrug 1500-2000 nt. Zur besseren Hybridisierung an die DNA-Fragmente auf dem DNA-Microarray wurde die cRNA auf eine Länge von 100-200 nt fragmentiert. Als Sonden wurden DNA-Mikroarrays der Typen MG_U74A und MG_U74Av2 (Affymetrix)

verwendet. Diese enthalten pro Gen bis zu 20 kurze DNA-Fragmente und ebensoviele Kontrollfragmente. Nach Hybridisierung des Arrays mit den biotinylierten cRNA-Fragmenten wurden die cRNA-Moleküle in einer Färbereaktion auf dem Array mit Streptavidin-Phycoerythrin markiert. Dieser Fluoreszenz-Farbstoff kann mit Laserlicht angeregt werden und erlaubt eine Quantifizierung der cRNA auf den Arraysektoren. Die Auswertung des Experiments erfolgte mit den Computerprogrammen der Firma Affymetrix. Von den 12.473 untersuchten Genen auf dem MG_U74Av2 Array wurden 216 Gene nach Induktion von Brn-3a in stärkerem oder vermindertem Maße als in der nicht induzierten Kontrolle transkribiert. Durch die Wahl geeigneter Filter wurde die Anzahl der Gene, die signifikante Veränderungen zeigen, weiter eingengt.

Brn3a regulierte Gene	fache Veränderung
Ankyrin-1, Spektrin bindendes Protein, unter anderem involviert in der Restriktion von Na-Kanälen und Zelladhäsionsproteine an erregbare Membranen im Zentralen Nervensystem, (U76758)	3,0
1a-associated invariant (1a) chain, (X00496)	-3,0
Unbekannt, cDNA aus Blastozysten, (C79108)	-3,2
Translationselongationsfaktor 1 β 2, (BC003899)	2,2
EST-Klon exprimiert in Mittelhirn, (AI849583)	-3,3
EST-Klon exprimiert in Basalganglien, (AI842108)	3,5
Kalium-Kanal Gen MK2, (M30440)	3,0
p130PITSL, Zyklin abhängige Proteinkinase, (L37092)	3,2

Tab. 2.2 Ergebnis der DNA-Array-Analyse

Angegeben ist der Faktor, um den sich die Expression der entsprechenden Gene nach Induktion von Brn-3a Expression im Klon NIH3T3-Klon #10 verändert hat. Werte mit negativem Vorzeichen stehen für eine Reduktion der Genexpression nach Induktion von Brn-3a.

Von den acht Genen mit veränderter Expression nach Brn-3a Induktion ist keins ein bekanntes Zielgen von Brn-3a.

3. Diskussion

Der Brn-3a Locus kodiert für zwei Proteine, Brn-3a(l) und Brn-3a(k). In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, wie beide Promotoren transkriptionell reguliert werden und inwiefern sie sich gegenseitig beeinflussen. Desweiteren wurde Brn-3a in verschiedenen *in vivo* und *in vitro* Systemen überexprimiert, um seine Eigenschaft als Onkogen genauer zu untersuchen.

3.1. Promotoranalyse von Brn-3a(l)

3.1.1. Transkriptionsstartstellen von Brn-3a(l)

Ein zentrales Element eines Promotors sind die Startstellen der Transkription. Entsprechende regulierende DNA Regionen liegen in der Regel in der unmittelbaren Umgebung der Startstellen für die RNA-Synthese. Der Bereich, in dem Transkriptionsstartstellen mit Hilfe von Primer Extension und anderen Methoden nachgewiesen werden können, ist etwa 600 nt lang. Da nicht immer das Exon, welches das Translationsinitiationskodon enthält, das erste transkribierte Exon ist - untranslatierte Exons können oft mehrere Kilobasen weiter stromaufwärts liegen - war es zur Versuchsplanung notwendig, Informationen auf die Lage des Promotors zu erhalten.

Zur Beurteilung, ob es sich bei der zu untersuchenden Region um die Promotorregion eines Gens handelt, können Homologien zwischen verschiedenen Promotorregionen herangezogen werden:

Eine sehr wichtige Eigenschaft vieler Promotorregionen sind sogenannte 'CpG-islands'. Transkriptionsfaktoren binden häufig an GC-reiche Regionen der DNA. Methylierung dieser GC reichen Regionen führt zur Repression der Transkriptionsinitiation. Dies könnte sich entwickelt haben, um unspezifisch aktivierte Transkription zu vermindern. In 98 % des Vertebratengenoms sind GC-reiche Regionen methyliert. Diese Methylierung am Cytosinring ist der erste von zwei Schritten zur Umwandlung von Cytosin in Thymin, welches vom endogenen Nukleotid nicht zu unterscheiden ist und somit auch nicht von der DNA-

Reparaturmaschinerie erkannt werden kann. Dadurch ist im Laufe der Evolution ein Großteil der GC-reichen Regionen aus dem Genom verschwunden. Übrig geblieben sind transkriptionell aktive Regionen, in denen keine DNA-Methylierung vorkommt. In der 5' Region des Brn-3a(l) Gens liegt der GC-Gehalt der DNA bei über 70 %, damit handelt es sich bei diesem Bereich um ein CpG-island. Diese Sequenzanalyse war der erste Hinweis auf eine Promotorregion direkt vor dem ersten translatierten Exon.

Weitere Informationen lieferte die Sequenzanalyse des 5' Bereichs von Brn-3a(l) mit Hilfe des Computerprogramms 'Promoter 2.0' des Zentrums für biologische Sequenzanalyse an der Technischen Universität Dänemark (<http://www.cbs.dtu.dk/services/promoter>). Bei Verwendung von 1140 nt Sequenz vor dem Translationsinitiationskodon konnte mit Hilfe dieses Computerprogramms eine Startstelle lokalisiert werden, die 340 nt vor dem Translationsinitiationskodon von Brn-3a(l) liegt.

Aufgrund dieser Informationen wurde die Sequenz vor dem Start-ATG von Brn-3a(l) auf das Vorhandensein einer TATA-Box (Konsensussequenz: TATAAAA) (Lee und Young, 1998) hin untersucht. Da im Bereich von bis zu 100 nt vor dem Translationsinitiationskodon von Brn-3a durch Sequenzvergleich keine TATA-Box zu lokalisieren war, handelt es sich damit beim Brn-3a(l) Promotor um einen TATA-losten Promotor, die häufig mehrere Startstellen der RNA aufweisen. Aufgrund dieser Analysen war davon auszugehen, daß die Startstellen der Transkription von Brn-3a(l) in dem analysierten Bereich liegen, und daß es sich um einen TATA-losten Promotor handelt.

Durch Primer Extension konnten mehrere mögliche Startstellen der RNA lokalisiert werden, die 727 nt, 406 nt, 299 nt und 252 nt vor dem Start-ATG liegen. Der dazu verwendete Primer lag 164 nt vor dem Startkodon.

Ein Nachteil der Primer Extension Methode ist, daß die dreidimensionale Struktur der RNA einen Abbruch der reversen Transkription schon vor dem 5' Ende der RNA hervorrufen kann. Ein solches Abbruchprodukt kann auf dem Röntgenfilm nicht von einem korrekt verlängerten Produkt unterschieden werden. Hierfür ist zusätzlich funktionelle Tests notwendig, sogenannte Reportergenexperimente. Dafür wurden Reportergenkonstrukte generiert, die entsprechende DNA-Fragmente enthielten, um zu überprüfen, ob sich die Transkriptionsrate

verändert, wenn man einzelne Startstellen der Transkription aus den Reportergenkonstrukten entfernt.

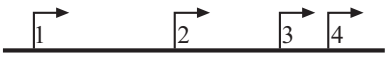



Reportergenkonstrukte	Reportergenaktivität bezogen auf SV40 Aktivität
	215 %
	90 %
	90 %
	2 %

Abb. 3.1 Zusammenfassung der Promotoraktivität von Brn-3a(l)

Eingezeichnet sind DNA Fragmente aus dem Brn-3a(l) Promotor und die dazugehörige Luziferaseaktivität der Reportergenkonstrukte. Die Luziferaseaktivität wurde über die des SV40 Promotors normiert. Das Entfernen der Startstelle #1 halbiert die Aktivität, Verlust von Startstelle #2 hat keinerlei Einfluß auf die Promotoraktivität. Wird Startstelle #3 entfernt, zeigt das verbleibende Reportergenkonstrukt keine Aktivität mehr. Die Anwesenheit von Startstellen #4 im Konstrukt ist nicht ausreichend zur Aktivierung der Transkription.

Die Ergebnisse der Reportergenexperimente zeigten, daß es sich bei dem kürzesten Produkt der reversen Transkription (#4) nicht um eine Startstelle der DNA handeln kann, da ein Reportergenkonstrukt, welches nur diesen Bereich enthält, keine Luziferaseaktivität aufweist. Ebenso trug die Startstelle #2 nicht zu erhöhter Transkription bei. Es könnte sich bei diesem Produkt der Primer Extension ebenfalls um ein Abbruchprodukt des längsten Transkripts handeln. Um dies genauer untersuchen zu können, müsste in das Konstrukt PL2 (enthält die Startstellen #2 bis #4) eine Mutation eingefügt werden, so daß die Transkription nicht mehr von der kürzeren, funktionellen Startstelle der RNA (#2) beginnen kann. Wenn das resultierende Reportergenkonstrukt keine Luziferaseaktivität mehr zeigt, würde das bedeuten, daß dieses Produkt der Primer Extension tatsächlich nur ein Abbruchprodukt ist.

Die beiden Hauptstartstellen sind also diejenigen, die 299 nt (#3) und 727 nt (#1) 5' des Translationsinitiationskodons detektiert wurden.

Die Startstelle #3 beinhaltet außerdem zwei weitere Promotorelemente, ein INR Element, durch das sich einige TATA-lose Promotoren auszeichnen und ein DPE, welches nur im Zusammenhang mit einem INR Element zu finden ist. Dies läßt auf eine funktionelle Transkriptionsinitiation an dieser Stelle schließen. Der Befund spricht dafür, daß es sich bei

dem Brn-3a(l) Promotor um einen TATA-losten Promotor handelt, der zwei DNA-Elemente aufweist, die einen Basalpromotor auszeichnen.

3.1.2. Promotoraktivität von Brn-3a(l)

Wenn die Startstellen der RNA bekannt sind, schränkt dies den Bereich, in dem Transkriptionsfaktoren, die an der Aktivierung/Repression der Transkription beteiligt sind, binden können, stark ein. Statistisch gesehen gibt es eine Häufung von Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen in der Region von 50 nt stromaufwärts der Transkriptionsstarts bis 120 nt nach dem Transkriptionsstart (Ioshikhes, *et al.*, 1999).

Der Brn-3a(l) Promotor zeigt eine starke Promotoraktivität. Das längste der getesteten Reportergenkonstrukte (PL1) wies eine zweifach höhere Aktivität im Vergleich mit der des starken SV40 Promotors auf (Shillitoe und Noonan, 2000). Die Aktivität ließ nach, wenn Transkriptionsstartstellen aus den Reportergenkonstrukten entfernt wurden. Im gesamten überprüften Bereich fand keine gewebespezifische Regulation der Transkripte statt, denn alle Reportergenkonstrukte zeigten in der humanen Zervixkarzinom Zelllinie HeLa die gleiche Aktivität wie in der neuronalen Ewingssarkom Tumorzelllinie StaEt1. Auch im längsten Konstrukt (3800 nt stromaufwärts vom Startkodon von Brn-3a(l)) (Daten nicht gezeigt), war keine gewebespezifische Regulation der Brn-3a(l) Transkription detektierbar. Enhancer der Transkription können aber auch sehr weit entfernt von den Startstellen der RNA liegen, z.B. auch 3' des Gens, somit in Bereichen, die hier nicht untersucht wurden. Es könnte also noch eines enormen Aufwands bedürfen, den DNA-Bereich, der für die gewebespezifische Regulation von Brn-3a(l) verantwortlich ist, zu ermitteln.

3.2. Promotoranalyse von Brn-3a(k)

3.2.1. Transkriptionsstartstellen von Brn-3a(k)

Da es sich um das humane Brn-3a Gen handelt, war es nicht möglich, Experimente an primärem Gewebe durchzuführen. Daher wurde kommerzielle pA⁺RNA aus embryonalem Gehirn verwendet, um durch RACE-PCR das 5' Ende von Brn-3a(k) zu bestimmen. Diese Methode ist aufwendiger aber auch sensitiver als die für Brn-3a(l) verwendete Primer Extension. Mit der kommerziell erworbenen pA⁺RNA konnte kein spezifisches RACE-PCR Produkt generiert werden. Das lag wahrscheinlich daran, daß die verwendete pA⁺RNA aus embryonalem Gehirn stammte, Brn-3a(k) aber nur in einem sehr limitierten Umfang in Hinterwurzelganglienzellen des Rückenmarks exprimiert wird (Theil, *et al.*, 1993). Von diesem Zelltyp war vermutlich keine oder wenig RNA in der kommerziell erhältlichen RNA-Präparation vorhanden.

Durch den Mangel an geeignetem Material zur Bestimmung der Startstellen der RNA von Brn-3a(k) mußte eine sensitivere Methode zur Ermittlung der Transkriptionsinitiationsstellen verwendet werden. Diese RACE-PCR-Methode hat den Nachteil, daß PCR-Artefakte zu falschpositiven Signalen führen können. Neben der durch 5' RACE-PCR ermittelten Startstelle wurden durch eine Primer Extension Reaktion mit der gleichen RNA weitere Startstellen im selben DNA-Abschnitt gefunden. 5' progressiv deletierte Reportergenkonstrukte zeigten, daß neben der durch RACE-PCR ermittelten Startstelle der RNA noch weitere existieren müssen, da das Reportergenkonstrukt PK8 (Abb. 2.14) eine sehr starke Promotoraktivität besitzt, obwohl es 13 nt nach der durch die 5' verankerte PCR ermittelten Startstelle beginnt. In diesem Konstrukt lagen jedoch noch drei weitere durch Primer Extension ermittelte Startstellen. Nicht zuletzt konnte mit dem Computerprogramm 'Promoter Inspektor' eine Promotorregion in diesem Bereich vorhergesagt werden (Tab. 2.1). Der Bereich, in dem die Transkripte von Brn-3a(k) beginnen können, ist durch die Existenz von Brn-3a(l) stark eingeschränkt. In diesem Bereich der DNA ist keine TATA-Box vorhanden, so sind auch hier mehrere Transkriptionsstartstellen wie bei Brn-3a(l) zu erwarten.





3.2.2. Promotoraktivität von Brn-3a(k)

Eine wesentlich interessantere Regulation als der Promotor von Brn-3a(l) wies der Promotor von Brn-3a(k) auf. Reportergerkonstrukte mit in beiden Richtungen progressiv deletierten Bereichen des Introns von Brn-3a(l) (Abb. 2.9) zeigten zunächst einen Bereich von 75 nt am 3' Ende der getesteten DNA. Dieser ist zuständig für die völlige Hemmung der ansonsten auch in diesem Promotor sehr starken Reportergeraktivität (Abb. 2.10). Zusätzlich zeigte die Transfektion dieser Konstrukte in die nicht neuronale Zelllinie HeLa, daß die Gewebespezifität der Aktivierung der Expression von Brn-3a(k) im analysierten DNA-Bereich koordiniert sein muß, da die Reportergeraktivität in HeLa Zellen um den Faktor 50 niedriger war als in StaEt1 Zellen. Hingegen wurde die Repression der Transkription, die im 75 nt Bereich des 3' Endes der Konstrukte PK1 und PK4-PK6 (vgl. Abb. 2.9 & Abb. 2.10) in den neuronalen Zelllinien ermittelt werden konnte, auch in HeLa Zellen beobachtet. Die Repression der Transkription ist also nicht gewebespezifisch, während im Fall von Brn-3a(k) die Aktivierung in Neuronen gewebespezifisch dann reguliert wird (vgl. Abb. 2.10.A & Abb. 2.10.B), wenn der 75 nt lange, repressorische 3' Bereich der Brn-3a(k) Promotorregion nicht in den Reportergerkonstrukten vorhanden ist.

Eine genauere Analyse dieser 3' Region schränkte den Bereich, der für die Inhibition der Transkription zuständig ist, weiter auf einen Bereich von 24 nt (S24) ein. Analysen der Brn-3a Reportergerkonstrukte, die am 5' Ende Promotorbereiche mit bzw. ohne S24 aufwiesen, zeigten, daß die vollständige Repression der Transkription nicht alleine durch S24 vermittelt wird. Zusätzlich ist eine auf 101 nt eingeschränkte Sequenz aus dem Exon 1 von Brn-3a(l) und dem Intron nötig, um vollständige Repression der Promotoraktivität zu erlangen (Abb. 2.14). Zwei Konstrukte, PK7 und PK1C, die sich nur um die 101 nt am 5' Ende unterscheiden, zeigten eine fast gleich hohe Promotoraktivität. Dies bedeutet, daß die Deletion der 101 nt keinen Einfluß auf die Promotoraktivität hat. Vergleicht man die entsprechenden Konstrukte mit S24, PK7S und PK1, steigt die Reportergeraktivität beim kürzeren Konstrukt auf das 50-fache im Vergleich zu PK1 an und ist nur noch um einen Faktor zwei geringer als bei dem gleichen Konstrukt ohne S24 (PK7). Der 101 nt lange Bereich ist also ein Verstärker von S24, da das Entfernen dieses Teils des 5' Bereichs von

Brn-3a(k) kaum einen Einfluß auf die Aktivität des Reporters hat (vgl. PK1C und PK7 in Abb. 2.14).

Weitere Verkürzung des 5' Bereichs führt zu einer Verringerung der Reporterogenaktivität, was sich aus dem Entfernen von RNA-Startstellen in den Reportergenkonstrukten erklärt, da dann die PolymeraseII nicht mehr effizient an die DNA binden kann. Generell scheint die basale Transkription des Brn-3a(k) Promotors höher als die des Brn-3a(l) Promotors zu sein, da sogar ein Konstrukt, welches 209 nt vor dem Translationsinitiationskodon beginnt und 86 nt vor diesem endet (PK9), immerhin noch eine Promotoraktivität besitzt, die bei 50 % der des starken SV40 Promotors in StaEt1 Zellen liegt.

Reportergenkonstrukte	Reportergenaktivität bezogen auf SV40 Aktivität
	82 %
	106 %
	0 %
	48 %

Tab. 3.2 Zusammenfassung der Luziferaseaktivität von Brn-3a(k)

Dargestellt sind Reportergenkonstrukte, die verschiedene Promotorelemente beinhalten und die dazugehörige Promotoraktivität, normiert auf die des SV40 Promotors. Das 5' gelegene Element wurde noch nicht durch EMSA Experimente bestätigt, jedoch gibt es in diesem Bereich eine 101 nt lange DNA-Sequenz, von der angenommen wird, daß ein Protein spezifisch daran bindet, da diese Sequenz einen verstärkenden DNA-Fragment bzw.

kenden Einfluß auf die repressorische Wirkung des S24-BRPs hat. Dieses 5' das möglicherweise daran bindende Protein wird mit S24-Enhancer bezeichnet.

Da S24 einen enormen Einfluß auf die Aktivität des Promotors von Brn-3a(k) hatte, wurde S24 näher untersucht. Eine Datenbanksuche ergab, daß in diesem Bereich kein bekanntes DNA-Bindungsmotiv eines DNA-bindenden Proteins liegt. Bindungsstudien mit S24 zeigten jedoch, daß Proteine existieren, die spezifisch an diese Sequenz binden. Es könnte sich daher bei S24 um einen klassischen Silencer handeln, bei dem ein DNA bindendes Protein (S24-BRP, S24 bindendes repressorisches Protein) an seine Erkennungssequenz im Promotor (S24) bindet und die Transkription reprimiert (Ogbourne und Antalis, 1998).

Interessanterweise liegt S24 in dem Teil des 5' Bereichs von Brn-3a(k), der im Exon 2 von Brn-3a(l) liegt. POU Faktoren werden durch Sequenzähnlichkeiten in Unterklassen eingeteilt.

So gehören alle Brn-3 Familienmitglieder zu den POU-IV Faktoren. Diese zeichnen sich durch eine große Ähnlichkeit der Aminosäuresequenz im N-Terminus der Proteine aus (POU-IV-Box, z.B. Brn-3a(l): AS 29-66) (Verrijzer und Van der Vliet, 1993). S24 liegt in diesem konservierten POU-IV-Box Bereich und unterscheidet sich nur in je zwei Nukleotiden von Brn-3b und Brn-3c Sequenzen. Er könnte also auch bei der transkriptionellen Regulation von Brn-3b(k) eine Rolle spielen (Brn-3c(k) ist nicht bekannt). Da die Sequenzähnlichkeiten zu den anderen Brn-3 Familienmitgliedern sehr hoch ist, könnte es sich beim S24-BRP um einen Faktor handeln, der speziell in die Regulation der Brn-3 POU Faktoren involviert ist.

Es konnte gezeigt werden, daß S24 einen generellen Einfluß auf heterologe Promotoren hat (Abb. 2.17). So war der virale SV40 Promotor schon durch das Einbringen der kurzen S24 Sequenz um 50-65 % reprimierbar. Die fast vollständige Repression des SV40 Promotors wurde erreicht, wenn neben S24 die weiter 5' gelegene 101 nt regulatorische DNA-Sequenz im Reportergenkonstrukt anwesend war (Abb. 2.17). Durch Mutationen in S24 konnten zwei wichtige Bereiche innerhalb von S24 identifiziert werden, deren Mutation die reprimierenden Eigenschaften von S24 teilweise aufheben und zu 40 % bzw. 60 % der SV40 Promotoraktivität führen (Abb. 2.18). Dieser Effekt kann von einer ineffizienten Bindung des S24-BRPs an seine Erkennungssequenz herrühren. Eine weitere Möglichkeit ist, daß das S24-BRP zwar an die DNA bindet, aber durch eine Konformationsänderung dann dem Interaktionspartner, der an der 101 nt Sequenz stromaufwärts bindet, keine Interaktionsfläche mehr bietet. Welche dieser Möglichkeiten zutrifft, muß in weiteren Experimenten geklärt werden, z.B. durch Mutation beider für die Wirkung des Repressors wichtigen Nukleotidbereiche auf S24. Zeigen solche Mutanten keine Repression mehr, weder bei Brn-3a Promotorkonstrukten, noch bei heterologen Promotorkonstrukten, ist dies ein deutlicher Hinweis darauf, daß eher die DNA-Bindung des S24-BRPs und nicht seine Konformation verantwortlich für den Verlust der Repression ist. Letzte Sicherheit kann nur ein EMSA Experiment mit dem einfach- und doppelmutierten dsOligodesoxynukleotid bringen.

Die Daten der Reporter-genexperimente mit S24 zeigten, daß dieser potentielle Silencerbereich die Promotoraktivität in einer orientierungs- und positionsunabhängigen Weise inhibieren und sowohl im nativen als auch in einem heterologen Promotor wirken kann. Der Einfluß von Silencer-Elementen und von repressorischen Proteinen auf die Genregulation kann auf vielfältige Weise erfolgen (Clark und Docherty, 1993):

Proteine, die die Transkription reprimieren, können beispielsweise Transkriptionsfaktoren im Zytoplasma zurückhalten, Einfluß auf die Chromatinstruktur oder das Spleißen nehmen, repressorisch auf die Aktivität von positiv regulierenden Transkriptionsfaktoren wirken oder Einfluß auf den Zusammenbau der Transkriptionsmaschinerie nehmen.

Für die Wirkungsweise von S24 bzw. S24-BRP können mehrere dieser Möglichkeiten ausgeschlossen werden. So ist es nicht möglich, daß es die Aufgabe des Repressors ist, Transkriptionsfaktoren im Zytoplasma zurückzuhalten, da S24-BRP ein DNA bindendes Protein ist, welches im Kern wirkt. Die Reporter-genexperimente wurden als transiente Transfektionen durchgeführt, dabei werden die Konstrukte nicht in das Genom integriert und sind folglich auch nicht für die Umorganisation von Chromatin zugänglich. Da Brn-3a(k) Prä-mRNA keine intronischen Sequenzen enthält, kann der Repressor nicht durch Einflußnahme auf den Spleißapparat wirken. Weil diese Möglichkeiten zur repressorischen Wirkungsweise ausschließen, muß S24-BRP also direkt auf aktivierende Transkriptionsfaktoren oder die Transkriptionsmaschinerie wirken.

Daraus ergibt sich folgendes hypothetisches Modell für die Wirkungsweise von S24 und seinen Partnern:

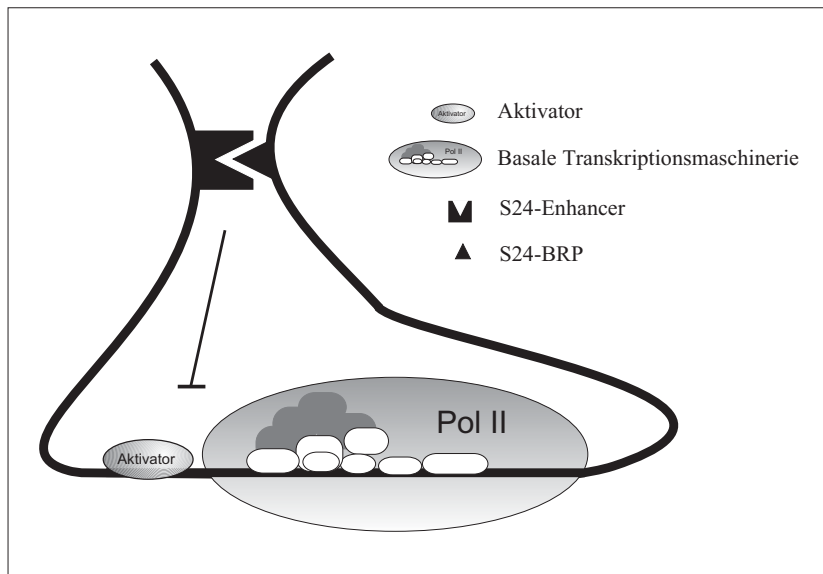


Abb. 3.3 Modell der Wirkung von S24-BRP und S24-Enhancer auf die Transkription

An S24 und S24-Enhancer binden die jeweiligen DNA bindenden Proteine S24-BRP und S24-Enhancer. Durch die Interaktion der Proteine wird die Transkription des Brn-3a(k) Gens verhindert. Der S24-Enhancer alleine hat keine repressorische Wirkung auf die Transkription, S24-BRP kann die Transkription nur zu 50 % inhibieren, beide gemeinsam können die Transkription des Brn-3a(k) Gens vollständig inhibieren.

3.2.3. Differentielle Aktivität beider Brn-3a Promotoren

Der Promotor von Brn-3a(l) liegt ungefähr 1200 nt entfernt von S24. Es besteht also durchaus die Möglichkeit, daß S24 einen Einfluß auf die Expression von Brn-3a(l) hat. Deshalb wurden Reportergenkonstrukte generiert, die beide Promotoren beinhalten (Abb. 2.18 & Abb. 2.19) und in transienten Transfektionen zur Bestimmung der Reporter-genaktivität eingesetzt. Dabei konnte gezeigt werden, daß die Promotoraktivität der PLK-Konstrukte (PLK = Promotor Brn-3a(Lang) & Brn-3a(Kurz)) durchweg geringer ist als die der entsprechenden Konstrukte, die nur den Promotor von Brn-3a(l) beinhalten. Jedoch ist die Repression der Promotoraktivität nicht so deutlich wie bei den Konstrukten, die nur den kurzen Promotor enthalten. Desweiteren ist die Promotoraktivität in HeLa Zellen (Daten nicht gezeigt) genauso groß, wie die in StaEt1 Zellen. Diese Experimente zeigen, daß die Gewebespezifität von Brn-3a(l) anders vermittelt wird als die von Brn-3a(k), und daß die gemessene Reportergenaktivität vom Promotor des Brn-3a(l) Gens hervorgerufen wird.

Brn3a(k) wirkt in Experimenten auf die durch Brn-3a(l) vermittelten Effekte antagonistisch. So zeigen beispielsweise Transformationsexperimente in primären Rattenfibroblasten, daß Brn-3a(k) die transformierenden Eigenschaften von Brn-3a(l) teilweise aufheben kann (Budhram-Mahadeo, *et al.*, 1995). Vermutlich ist deshalb eine zeitliche und räumliche

Trennung der Brn-3a(l) und Brn-3a(k) Expression wichtig für die Funktion von Brn-3a(l) und Brn-3a(k). Beide Proteine werden in unterschiedlichen Mengen in verschiedenen Neuronen exprimiert (Liu, *et al.*, 1996). Darauf weist auch die Analyse der Promotoren von Brn-3a(l) und Brn-3a(k) hin und die dabei gefundene unterschiedliche Regulation der Gewebespezifität. Da aber der Promotor von Brn-3a(k) im Intron von Brn-3a(l) liegt, ist eine zusätzliche Regulation wichtig. Dies ist offenbar die Funktion von S24, denn der Silencer wirkt nur auf das Brn-3a(k) Gen und hat einen sehr geringen Einfluß auf die Expression von Brn-3a(l).

Die verwendete Methode (transiente Transfektion von Reporter-genkonstrukten) stößt an ihre Grenzen, wenn es um die Untersuchung längerer DNA Bereiche geht. *In vivo* sind Bereiche, die in den Reporter-genkonstrukten leicht zugänglich sind, eventuell nicht in die Regulation von Brn-3a involviert, weil sie als Chromatin verpackt sind. Mehr Informationen z.B. über Chromatin Umorganisation könnten stabile Reporterzelllinien oder transgene Mäuse mit verschiedenen Promotorfragmenten vor einem Reporter-gen geben. Jedoch haben beide Ansätze den Nachteil, daß die Konstrukte zufällig ins Genom integrieren und Effekte der umliegenden DNA auf die Reporter-genexpression nicht ausgeschlossen werden können. Die eleganteste Lösung des Problems wäre eine 'Knockin' Maus, bei der das Brn-3a(k) Gen durch ein Reporter-gen ersetzt werden könnte und gleichzeitig Mutationen in S24 eingeführt werden könnten.

3.3. Überexpression von Brn-3a

3.3.1. Brn-3a Überexpression in induzierbaren NIH3T3 Zelllinien

Da Brn-3a ein Protoonkogen ist, sollte seine Überexpression dazu beitragen, Zellen zu transformieren. Ein System zur Untersuchung solcher Zusammenhänge ist ein induzierbares Zellsystem, da dieselbe Zelllinie, wenn keine Brn-3a Expression induziert wurde, als Negativkontrolle eingesetzt werden kann. So können Effekte, die durch Integration der Brn-3a Expressionskassette ins Genom hervorgerufen werden, ausgeschlossen werden. Es kann z.B. zu erhöhter oder erniedrigter Expression von Proteinen kommen, deren Gene am Ort der

Integration liegen, bei induzierbaren Systemen spielt dieses Problem eine untergeordnete Rolle, da die nicht induzierten Zellen den gleichen Einfluß ausgesetzt sind.

Obwohl die induzierbaren Zelllinien deutlich mehr Brn-3a produzierten als die neuronalen Zelllinien StaEt1, Sal2 und RDES, konnte in diesen Zellen keinerlei Veränderung bei der Expression von Brn-3a(l) festgestellt werden. NIH3T3 Zellen sind Fibroblasten, die normalerweise kein Brn-3a(l) exprimieren. Daher wurden sie verwendet, um einen klaren Unterschied zwischen induziertem und nicht induziertem Zustand darzustellen. Möglicherweise fehlen dieser nicht neuronalen Zelllinie aber Proteine, mit denen das Brn-3a(l) Protein interagieren muß, um seine Effekte auf die Zellen ausüben zu können. Daher wäre eine Neuroblastom Zelllinie, die Brn-3a nicht endogen exprimiert besser für diese Experimente geeignet gewesen.

Um mögliche Effekte von Brn-3a in neuronalen Zellen messen zu können, wurden transiente Transfektionen mit neuronalen ND7 Zellen durchgeführt (Hybridzelllinie einer Neuroblastomzelllinie und murinen Hinterwurzelganglienzellen), die sowohl Brn-3a(l) als auch Brn-3a(k) in geringen Mengen exprimieren. Überexpression von Brn-3a zeigte einen erhöhten Anteil von Zellen, die durch Apoptose zugrunde gehen. Dies ist weder mit der Wirkungsweise von Brn-3a als Onkogen noch mit der Tatsache, daß der Apoptoseinhibitor Bcl2 ein Zielgen von Brn-3a ist, zu erklären. In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch an verschiedenen Systemen (transiente Transfektionen, stabile, induzierbare Zelllinien und transgene Mäuse) gezeigt werden, daß Überexpression von Brn-3a die Expression von Bcl2 nicht beeinflußt, obwohl Ensor *et al.* (Ensor, *et al.*, 2001) beschreiben, daß die Menge an Bcl2 Protein bei Überexpression von Brn-3a auf das Dreifache ansteigt.

3.3.2. DNA-Array-Expressionsanalyse

Da die DNA-Array-Analyse differenziertere Daten über die Wirkung eines Proteins liefern kann als die Untersuchung einzelner Bereiche wie Zellzyklus, Apoptose etc., wurde mit den stabilen Zelllinien ein solches Experiment durchgeführt. Die Ergebnisse dieses Versuchs

konnten bestätigen, daß Brn-3a eine Rolle in neuronaler Genexpression spielt. Jedoch wurde keins der bekannten Zielgene von Brn-3a in dieser Analyse aktiviert bzw. reprimiert, was wiederum den Befund unterstützt, daß Brn-3a nicht die Bcl2 Expression reguliert. Das generelle Fehlen bekannter Zielgene in der Array-Analyse könnte zum einen daran liegen, daß zu wenige der induzierten Zellen auch wirklich eine ausreichende Expression des Brn-3a Gens aufweisen konnten, zum anderen könnte es am gewählten Zellsystem liegen. Der NIH3T3-Klon wurde verwendet, weil er keine detektierbare Brn-3a Expression zeigte, eine Induktion von Brn-3a Expression also zu deutlicheren Effekten führen sollte als die Überexpression von Brn-3a in Zellen, die Brn-3a bereits detektierbar exprimieren. Eventuell hätte die Verwendung einer neuronalen Zelllinie ein anderes Set von regulierten Genen gezeigt. Um dieser Frage nachzugehen müßte das gleiche Experiment mit einer neuronalen Zelllinie oder transgenen Mäusen wiederholt werden. Letztere haben jedoch den Nachteil, daß Integrationseffekte des Transgens in das Genom eine Rolle spielen können, die nur sehr schwer, z.B. durch Verwendung verschiedener transgener Mausstämme, aus den Array-Daten zu eliminieren ist.

Bei der Array-Analyse zeigten 216 der 12.473 untersuchten Gene eine Veränderung der Expression. Durch Verwendung eines Filters wurden solche Gene ausgeschlossen, bei denen nur wenige der meist 20 Oligonukleotide aus denen ein Datensatz für ein Gen besteht, eine Veränderung der Genexpression zeigten. Außerdem wurden Gene eliminiert, deren Veränderung der Genexpression nach Induktion von Brn-3a nur maginal war. Deshalb könnten die in der Array-Analyse ermittelten Gene tatsächlich Zielgene von Brn-3a sein. Dies muß in weiterführenden Experimenten wie beispielsweise Reportergenexperimenten mit den Promotoren der putativen Zielgene in An- und Abwesenheit von Brn-3a näher untersucht werden.

3.4. Weiterführende Arbeiten

Nicht geklärt ist bisher, wie die Gewebespezifität von Brn-3a(l) reguliert wird. Enhancer, die dafür verantwortlich sind, können sehr weit entfernt vom Promotor liegen, so daß es einen hohen Aufwand erfordern wird, danach zu suchen. Interessanter als die Regulation von

Brn-3a(l) ist die des Brn-3a(k) Gens. Obwohl in dieser Arbeit die Regulationsweise dieses Promotors aufgeklärt werden konnte, blieben noch einige Fragen offen. Es konnte gezeigt werden, daß an die S24 Sequenz ein Protein bindet. Es ist jedoch nicht bekannt, ob es sich dabei um ein bereits bekanntes oder um ein neues Protein handelt, dessen Identität zu klären wäre. Der 101 nt Bereich, in dem sich der S24-Enhancer befindet, kann möglicherweise noch weiter eingeengt werden. Das wäre notwendig, um letztendlich ein kurze Sequenz mutieren und in Transfektionsexperimenten einsetzen zu können. Desweiteren müßte die mutierte Sequenz in EMSA Experimenten eingesetzt werden, um herauszufinden, ob an der S24-Enhancer DNA-Sequenz wie vermutet ein Protein bindet.

In Bezug auf den Brn-3a(k) Promotor wäre eine transgene Maus mit dem Promotorfragment aus PK1C von Vorteil. Sollte die gesamte Gewebespezifität in dem kurzen DNA-Fragment von 770 nt übermittelt werden, wäre dies ein idealer Promotor zur Analyse von anderen neuronalen Genen, da er sich durch eine starke Promotoraktivität auszeichnet. Seine kurze Sequenz ließe genügend Spielraum zum Inserieren der zu untersuchenden Gene in die entsprechenden Vektoren. Hierfür müßte zunächst eine Maus mit einem Reportergen hinter dem PK1C Fragment generiert werden, um das Expressionsmuster des möglichen Transgenpromotors genau zu analysieren.

Die Daten der Expressionsanalyse spiegeln die Bedeutung von Brn-3a während der Embryogenese und in Neuronen wieder. Weitere Analysen mit anderen Zelllinien und transgenen Mäusen könnten ein genaueres Bild der Wirkung des Brn-3a Gens liefern.

4. Material & Methoden

Die Arbeitsprotokolle sind, sofern nicht auf andere Literaturquellen verwiesen wurde, den Methodensammlungen von Ausubel, *et al.*, 1987 und Sambrook, *et al.*, 1989 entnommen.

4.1. Chemikalien und Enzyme

Soweit nicht anders vermerkt, wurden alle Chemikalien und Enzyme von den Firmen Life Technologies, Merck Eurolab, New England Biolabs, Roche, Roth und Sigma bezogen. Radioaktiv markierte Substanzen wurden von Amersham Pharmacia Biotech bezogen. Oligodesoxynukleotide wurden von den Firmen Life Technologies und MWG Biotech synthetisiert.

4.2. DNA Sonden

Sonde für Phagenscreen: 900 nt *SacI* Fragment aus dem 5' Bereich des hBrn-a Gens

4.3. Oligodesoxynukleotide

Phagenscreen:

H3A9

H3APE3 GAT GCA TGG CAA AGT GAG GCT GC

Klonierung von Reportergenkonstrukten:

PL4, PL5:

PCR-PL4-AP1 CGC GGT ACC AGC GCG GTG GGG CCG CCG AG

PCR-PL4-AP2 CGC GGT ACC GAG CTC TCG CAG AGC TCC C

PL-ATG TAT GGA TCC TCG TGG CGG CTT GGC ATG

PK1A-PK1E:

PL8f GCA GCC TCA CTT TGC CAT GCA TC

PL8.1r CGC GGA TCC GGC CCG GCC AGC AGC

PL8.2r CGC GGA TCC TCG TCC AGG CTG GCG

PL8.3r CGC GGA TCC GAG GTT GCT CGG TGC

PL8.4r CGC GGA TCC ACG GCC GCC AGG CCT C

PL8.5r CGC GGA TTC AGG CCT CGG CCC GGC

S24 Konstrukte:

24 Bgl-T	GAT CTG AGG CCT GGC GGC CGT GGA CAT CGC CGT GC
24 Bgl-B	GAT CTC ACG GCG ATG TCC ACG GCC GCC AGG CCT CC
24 Xho-T	TCG AGG AGG CCT GGC GGC CGT GGA CAT CGC CGT GA
24 Xho-B	TCG AGC ACG GCG ATG TCC ACG GCC GCC AGG CCT CA
24 Nhe-T	CTA GGG AGG CCT GGC GGC CGT GGA CAT CGC CGT GA
24 Nhe-B	CTA GGC ACG GCG ATG TCC ACG GCC GCC AGG CCT CA

PLK-Serie, PK7-PK9, PK7S-PK9S:

ATG-weg-T	CTC ACT TTG CCTAGC ATC CCA CCC
ATG-weg-B	GGG TGG CAT GCT AGG CAA AGT GAG
-500-Kpn	GGG GTA CCC CGT GCG CAT GCC CGG GTA GC
+7275-Xba	GCT CTA GAG CGG CCC GGC CAG CAG CAG CGT C
+7299-Xba	GCT CTA GAG CGA TGT CCA CGG CCG CC

Primer Extension:

H3APE4	GCT CCC TCT GAC CGC GC
--------	------------------------

Sonstige Primer:

G3PDH5'	ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC
G3PDH3'	TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA

4.4. Vektoren

pBluescriptII (Stratagene), pSL1180 (Amersham Pharmacia Biotech), pGL3-promoter (Promega), pGL3-basic (Promega), pREV-TRE (Clontech), pREV-OFF (Clontech)

4.5. Häufig verwendete Lösungen

Bei Prozentangaben wird im folgenden auf die Angabe (w/v) und (v/v) verzichtet. Beim Mischen von Flüssigkeiten wurden immer Volumenprozent verwendet (einzige Ausnahme: Glycerol); wurden Feststoffe zu Lösungen gegeben, erfolgte die Berechnung stets in Gewichtsprozenten.

TE	10 mM 1 mM	Tris/HCl pH 7,9 EDTA
TAE	40 mM 2 mM	Tris/Acetat pH 7,8 EDTA
20x SSC	3 M 0,3 M	NaCl Na-Citrat pH 7,0 einstellen
10x TBE	900 mM 20 mM	Tris/Borat pH 8,3 EDTA
LB-Medium	20 g/l	LB Broth Base pH 7,2 einstellen
LB-Agar	15 g/l	Bacto-Agar in LB-Medium
Ampicillin (1000x)	80 mg/ml	
Kanamycin (1000x)	25 mg/ml	
6xDNA-Puffer	50 % 0,02 % 0,04 % 1 mM	Glycerol Bromphenolblau Xylencyanol EDTA
EtBr-Lösung	1 mg/ml in TE	
PBS	137 mM 2,6 mM 1,5 mM 6,5 mM	NaCl KCl KH ₂ PO ₄ Na ₂ HPO ₄ pH 7,3 einstellen

4.6. Gelelektrophorese und Transfer auf Nylonmembranen

4.6.1. Agarose-Gelelektrophorese

Endonukleaseverdaute DNA (4.9.6) wurde in horizontalen Agarosegelen aufgetrennt. Je nach Fragmentgröße wurden 0,8-2,0 %ige Gele in TAE Puffer mit 0,01 µg/ml Ethidiumbromid verwendet. Die Gele wurden mit 0,1-3,0 µg DNA in DNA-Auftragepuffer beladen. Die

Auftrennung erfolgte bei 100-160 V mit TAE als Laufpuffer. Mit Hilfe des in die DNA interkalierenden Ethidiumbromids konnte diese DNA bei einer Wellenlänge von $\lambda = 302 \text{ nm}$ sichtbar gemacht werden. Genomische DNA wurde über Nacht bei 26 V aufgetrennt.

4.6.2. Transfer von DNA auf Nylonmembranen (Southern Blot)

(Southern, 1975)

DNA-Fragmente wurden in einem Agarosegel elektrophoretisch (5.6.1) aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel 20 Minuten in 0,25 M HCl depuriniert und danach in 0,4 M NaOH neutralisiert (20 Minuten). Zum Transfer der DNA auf eine Nylonmembran (Blotting-Nylon Membran, Fluka) wurde die Methode des Schwerkraft-Alkali-Transfers verwendet. Durch UV-Vernetzung wurde die DNA in einem Stratalinker (Stratagene) bei 120 mJ kovalent an die Membran gebunden.

4.6.3. Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zum Nachweis von DNA-Protein-Komplexen (5.9.15) wurden native Polyacrylamidgele verwendet. 100 ml BS-Gellösung wurden mit 1 ml APS (10 %) und 100 μl TEMED versetzt und in eine vertikale Gelapparatur (290 mm x 200 mm x 1 mm) gegossen. Die Auftrennung erfolgte bei 250 V für 2 bis 5 Stunden. Anschließend wurde das Gel auf ein Whatman 3MM-Papier transferiert und dann bei 80 °C im Ölpumpenvakuum für 2 Stunden getrocknet. Auf das getrocknete Gel wurde ein BiomaxTM MR Röntgenfilm (Kodak) aufgelegt, dieser nach 24 Stunden entwickelt und ausgewertet. Alternativ wurde eine Imagerplatte für 12 Stunden exponiert und dann im Bioimager (Raytest) ausgewertet.

BS-Gellösung	76,5 ml	H ₂ O
	2,5 ml	10x TBE
	12,3 ml	Rotiphorese® Gel 30 (Roth)
	7,7 ml	Rotiphorese® Gel A (Roth)

4.6.4. Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Primer Extension Reaktionsansätze (5.10.2) wurden in 4 %igen Polyacrylamid-Harnstoff-Gelen aufgetrennt. Diese Gele wurden horizontal zwischen zwei sauberen Glasplatten blasenfrei gegossen. Hierzu wurden 60 ml Sequenziergellösung mit 500 µl (10 % APS) und 40 µl TEMED versetzt. Sofort nach Gießen des Gels wurden Haifischkämme mit der glatten Seite zum Gel hineingesetzt. Nach vollständiger Polymerisation wurde das Gel in eine vertikale S2-Gelapparatur (Life Technologies) eingesetzt. Als Kathodenpuffer wurde 1x TBE, als Anodenpuffer 3x TBE verwendet. Die Haifischkämme wurden herausgezogen und mit den Zähnen zum Gel hin eingesetzt. Das Gel wurde bei 65 W für ungefähr 30 bis 60 Minuten vorgewärmt. Erst dann wurden Proben aus den Primer Extension Reaktionen aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 65 W für 2 bis 5 Stunden. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde die kleine, silanisierte Glasplatte entfernt, das Gel auf ein Whatman 3MM-Papier transferiert und anschließend bei 80 °C für 30 Minuten im Ölpumpenvakuum getrocknet. Auf das getrocknete Gel wurde ein BiomaxTM MR Röntgenfilm (Kodak) aufgelegt, dieser nach 24 Stunden entwickelt und ausgewertet. Alternativ wurde eine Imagerplatte für 12 Stunden exponiert und dann im Bioimager (Raytest) ausgewertet.

Sequenziergellösung	4 %	Acrylamid
	0,3 %	Bisacrylamid
	7 M	Harnstoff
		in TBE

4.6.5. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

(Laemmli, 1970)

Proteine (4.11.2) wurden in diskontinuierlichen, denaturierenden Polyacrylamidgelen elektrophoretisch in einer Mini-Proteingelapparatur (Keutz) aufgetrennt. Die Proteinproben wurden mit dem entsprechenden Volumen 4x SDS-Probenpuffer versetzt und 5 Minuten bei 95 °C denaturiert. Die Auftrennung erfolgte zunächst bei 20 mA pro Gel im Sammelgel und anschließend bei 30 mA pro Gel im Trenngel; als Puffer wurde 1x SDS-Laufpuffer

verwendet. Als Molekulargewichtsstandard wurden 6 µl Broade Range Prestained Marker (New England Biolabs) verwendet.

Trenngelpuffer	1,5 M 0,4 %	Tris/HCl pH 8,8 SDS
Sammelgelpuffer	0,5 M 0,4 %	Tris/HCl pH 6,8 SDS
10xSDS-Laufpuffer	0,25 M 1,9 M 1 %	Tris Glycin SDS
4x SDS-Probenpuffer	200 mM 60 % 6 % 10 % 0,2 %	Tris/HCl pH 6,8 Glycerol SDS β-Mercaptoethanol Bromphenolblau
Rotiphorese® Gel 30 (Roth)	30 % 0,8 %	Acrylamid Bisacrylamid

	Trenngel			Sammelgel
	10 %	12,5 %	15 %	4 %
Trenngelpuffer	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	–
Sammelgelpuffer	–	–	–	1,25 ml
Wasser	4,09 ml	3,25 ml	2,42 ml	3,03 ml
Rotiphorese® Gel 30	3,33 ml	4,17 ml	5,00 ml	0,67 ml
10 % APS	50 µl	50 µl	50 µl	25 µl
TEMED	30 µl	30 µl	30 µl	25 µl

Tab. 4.1 Zusammensetzung der denaturierenden Proteingele
Menge ausreichend für 2 Mini-Gele

4.6.6. Proteintransfer und -nachweis

Zum Transfer von Proteinen auf Nylonmembranen wurde das Semi-dry-Verfahren (Transfer-Apparatur der Fa. Keutz) angewandt. Dazu wurde auf der Graphitanode ein Blot in folgender Reihenfolge aufgeschichtet: 3 Whatman 3MM-Papiere angefeuchtet mit Anodenpuffer 1, 3 Whatman 3MM-Papiere angefeuchtet mit Anodenpuffer 2, eine Hybond C Membran (Amersham Pharmacia Biotech) mit Anodenpuffer 2 angefeuchtet, Proteingel mit Anodenpuffer 2 angefeuchtet und abschließend 3 Whatman 3MM-Papiere mit Kathodenpuffer angefeuchtet. Der Proteintransfer auf die Nylonmembran erfolgte mit 75 mA pro Gel für 90 Minuten. Zur Kontrolle des Transfers wurde die Membran 1 Minute mit Ponceau S (Serva) angefärbt und anschließend mit PBS wieder entfärbt.

Zum Nachweis der gesuchten Proteine wurden zunächst freie Bindungsstellen auf der Membran mit Blotto abgesättigt (Inkubationszeit 30 Minuten). Anschließend wurde der Blot mit dem Erstantikörper in Blotto für 2 Stunden bei RT inkubiert. Die Membran wurde mehrmals mit 0,05 % Tween 20 in PBS gewaschen und für 30 Minuten mit einem Meerrettichperoxidase gekoppelten Zweitantikörper (1:5000 in Blotto, Dianova) bei RT inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit 0,05 % Tween 20 in PBS wurde der Blot entwickelt. Hierzu wurden 10 ml der ECL Entwicklerlösung mit 3,1 µl H₂O₂ (30 %) gemischt, der Blot 1 Minute in der aktivierten Entwicklerlösung geschwenkt und anschließend in Haushaltsfolie eingeschlagen. Ein BiomaxTM MR Röntgenfilm (Kodak) wurde aufgelegt und nach 30 Sekunden bis 30 Minuten entwickelt.

Anodenpuffer 1	300 mM	Tris-Base
	10 %	Methanol
Anodenpuffer 2	30 mM	Tris-Base
	10 %	Methanol
Kathodenpuffer	40 mM	6-Aminohexansäure
	30 mM	Tris-Base
	10 %	Methanol

Blotto	3 %	Magermilchpulver in PBS/0,05 % Tween 20
ECL-Entwicklerlösung	10 ml/l 4,45 ml/l	ECL-A (250 mM Luminol in DMSO) ECL-B (90 mM p-Coumarsäure in DMSO) in 100 ml Tris/HCl pH 8,5 lichtgeschützt bei RT lagern

4.7. Phagen

Zur Isolierung von humanen genomischen DNA-Klonen wurde eine humane genomische DNA-Bibliothek der Firma Stratagene (Bestellnummer 945201) verwendet. Diese wurde durch Subklonierung von genomischen DNA-Fragmenten in den Vektor Lambda DashII generiert

Phagenmedium	10 mM 0,2 %	MgSO ₄ Maltose in LB-Medium
Phagenagar	1,5 %	Agar in Phagenmedium
Topagar	0,75 %	Agarose in Phagenmedium
SM-Puffer	100 mM 50 mM 10 mM 0,01 %	NaCl Tris/HCl pH 7,5 MgSO ₄ Gelatine autoklavieren

4.7.1. Präparation von Wirtsbakterien

50 ml Phagenmedium wurde mit 2 ml einer Übernachtskultur des Bakterienstamms C600 (F⁻ [e14(McrA⁻) or e14⁺(McrA⁺)]*thr-1leuB6thi-1lacY1glnV44rfbD1fhuA21*) angeimpft und im Schüttelinkubator bei 250 Upm und 37 °C bis zum Erreichen von OD₆₀₀ = 1,0 inkubiert. Die Bakterien wurden sedimentiert und in 50 ml 10 mM MgSO₄ resuspendiert.

4.7.2. Bestimmung des Phagentiters und Ausplattieren

Zur Titerbestimmung wurde eine Verdünnungsreihe der genomischen Bibliothek in SM-Puffer angefertigt. Jeweils 10 µl eines Ansatzes wurden mit 200 µl Wirtsbakterien gemischt und 15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die infizierten Wirtsbakterien mit 3 ml aufgeschmolzenem, auf 50 °C temperierten Topagar gemischt und auf einer 37 °C warmen Phagenagarplatte (92 mm) ausplattiert. Nach 12-16 Stunden Inkubation bei 37 °C waren Plaques im Bakterienrasen zu erkennen, mit deren Anzahl der Titer der genomischen Bibliothek bestimmt wurde (pfu/ml).

4.7.3. Durchmustern einer genomischen DNA-Bibliothek

Um den Aufwand für das Durchmustern der genomischen Bakteriophagenbibliothek zu verringern, wurden zunächst 20 Platten mit je 50.000 pfu pro Phagenplatte (92 mm) ausplattiert, so daß 10^6 Klone analysiert werden konnten. Die Bakteriophagen wurden von den durchlysierten Platten geerntet. Hierfür wurden die Platten für 1,5 Stunden mit 4 ml SM-Puffer bei Raumtemperatur geschwenkt und nach 1 Stunde Inkubationszeit ein Tropfen Chloroform zugegeben. 1 ml der Phagensuspension wurde sedimentiert (2 Minuten, 5000 Upm), der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit einem Tropfen Chloroform versetzt. Jeweils 5 µl der Plattenlysate wurden in einer PCR-Reaktion eingesetzt. Der erste Denaturierungsschritt der PCR wurde auf 5 Minuten verlängert, um die Phagen zu zerstören. Es wurden genspezifische Primer verwendet, um Phagenaliquots mit der gesuchten Sequenz zu identifizieren. Von diesen Phagenaliquots wurde der Titer bestimmt.

Zum Durchmustern der Phagenbibliothek wurden 40.000 pfu pro Phagenplatte (145 mm) eingesetzt, sowie 500 µl Wirtsbakterien und 7 ml Topagar. Je Phagenaliquot wurden 2 Platten ausplattiert. Die Herstellung der Filterabzüge erfolgte wie in Sambrook *et al.* (Sambrook, *et al.*, 1989) beschrieben. Beim Filter ziehen war es wichtig, die Position der Membran auf der Platte genau zu markieren. Zur Vernetzung der DNA mit der Membran wurden die Filter 2 Stunden bei 80 °C im Unterdruck inkubiert. Anschließend wurden die Filter mit 2x SSC angefeuchtet und für 2 Stunden bei 42 °C in Prähybridisierungslösung

inkubiert. Zur Hybridisierung wurde frische Prähybridisierungslösung mit 10^6 cpm/ml einer radioaktiv markierten Sonde (4.9.13) versetzt. Nach der Autoradiographie der gewaschenen Filter wurden die Signale auf dem Röntgenfilm einer Plaqueregion auf der Phagenplatte zugeordnet. Der entsprechende Bereich wurde mit Hilfe einer Pasteurpipette ausgestochen und mit 500 µl SM-Puffer eluiert. Je 5 µl des Ansatzes wurden in einer PCR-Reaktion eingesetzt. Aliquots, die ein positives PCR-Signal aufwiesen, wurden vereinzelt. Hierfür wurde das Aliquot so ausplattiert, daß sich 50-100 Plaques auf einer 92 mm Phagenplatte befanden. Nach erneutem Filter ziehen und hybridisieren wurden wiederum Einzelplaques ausgestochen und Einzelplaque-SM-Extrakte hergestellt. PCR positive Rekombinanten wurden eventuell nochmals vereinzelt. Anschließend wurde ein Hochtiter-SM-Extrakt hergestellt, indem 40.000 Pfu auf eine 92 mm Phagenplatte ausplattiert wurden und die Plaques wie oben beschrieben eluiert wurden. Diese Hochtiter-SM-Extrakte dienten zur Herstellung von Phagen-DNA (4.9.4).

Prähybridisierungslösung	50 %	Formamid, deionisiert
	5x	SSC
	5x	Denhardt's
	0,5 %	SDS
	500 µg /ml	Heringssperma-DNA, denaturiert
100xDenhardt's	2 %	Ficoll 400
	2 %	BSA
	2 %	Polyvinylpyrrolidon

4.8. Bakterien

4.8.1. Herstellung kompetenter Bakterien

Transformationskompetente DH5 α -Bakterien (*supE44,hsdR17,recA, Δ lacU169,(ϕ 80lacZ Δ M15),endA1,gyrA96,thi-1,relA1)* wurden nach der CaCl₂-Methode hergestellt. Dazu wurden 300 ml LB-Medium mit 5 ml einer Übernachtskultur angeimpft und bei 37 °C, 250 Upm in einem Schüttelinkubator inkubiert. Nach Erreichen von OD₆₀₀ = 0,4-0,6 (logarithmische Wachstumsphase) wurden die Bakterien 20 Minuten auf Eis inkubiert, in

50 ml PP-Röhrchen überführt und zentrifugiert (4 °C, 2500 Upm). Die Bakterienpellets wurden in je 25 ml eiskalter 0,1 M CaCl_2 -Lösung resuspendiert. Nach einstündiger Inkubation wurden die Bakterien erneut sedimentiert. Die Pellets wurden in je 2 ml 0,1 M CaCl_2 -Lösung resuspendiert. Die Suspensionen wurden vereinigt und nochmals 2 Stunden auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von Glycerol in einer Endkonzentration von 20-30 % wurde die Bakteriensuspension aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

4.8.2. Transformation kompetenter Bakterien

5 µl eines Ligationsansatzes (4.9.11) oder 0,1-10 ng Plasmid-DNA wurden mit 100 µl einer auf Eis aufgetauten Suspension kompetenter Bakterien gemischt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock im Wasserbad durch Inkubation für 90 Sekunden bei 42 °C. Nach Zugabe von 1 ml LB-Medium wurde der Ansatz 1 Stunde bei 37 °C geschüttelt. Entsprechend des Selektionsmarkers des Plasmids wurden die Bakterien auf LB-Agarplatten mit dem jeweiligen Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

4.9. DNA

4.9.1. Isolierung von Plasmid-DNA aus 3 ml Kulturen

3 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum wurden mit einer Einzelkolonie des plasmidtragenden Bakterienstammes angeimpft und über Nacht bei 37 °C im Schüttelinkubator inkubiert. 1,5 ml der Kultur wurden sedimentiert (Mikrofuge, 2 Minuten, 13000 Upm). Das Pellet wurde in 150 µl Mini 1 resuspendiert. Die Bakterien wurden anschließend durch Zugabe von 150 µl Mini 2 lysiert. Versetzen mit 150 µl Mini 3 führte zur Fällung der SDS-Protein-Komplexe. Diese wurden abzentrifugiert (5 Minuten, 13000 Upm). Der Überstand wurde in einem neuen Reaktionsgefäß mit gleichem Volumen Isopropanol versetzt, und das DNA-Präzipitat sedimentiert (15 Minuten, 13000 Upm). Das Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, bei 37 °C getrocknet und in 100 µl TE aufgenommen.

Mini 1	50 mM	Tris/HCl pH 8,0
	10 mM	EDTA
	100 µg /ml	RNase A
Mini 2	0,2 M	NaOH
	1 %	SDS
Mini 3	3 M	Kaliumacetat
		pH 5,5 einstellen mit Essigsäure

4.9.2. Isolierung von Plasmid-DNA im präparativen Maßstab

Zur Gewinnung von aufgereinigter DNA in größeren Mengen wurde der Plasmid Maxi Kit der Fa. Qiagen verwendet. 150 ml Bakteriensuspension wurden sedimentiert und nach Angaben des Herstellers über Ionenaustauscher-Säulen aufgereinigt. Die Plasmid-DNA wurde in TE resuspendiert.

4.9.3. Isolierung von genomischer DNA

Durch Biopsie gewonnene Mausschwanzspitzen wurden in 750 µl Lysispuffer aufgenommen, über Nacht bei 56 °C inkubiert und anschließend zentrifugiert (Mikrofuge, 15 Minuten, 13000 Upm). Der Überstand wurde mit 500 µl Isopropanol versetzt, die präzipitierte DNA wurde mit Hilfe einer Pipettenspitze in ein frisches Reaktionsgefäß überführt, mit 70 % Ethanol gewaschen, zentrifugiert und in 100 µl TE aufgenommen. Die Lagerung von genomischer DNA erfolgte bei 4 °C.

MMTB-Puffer	100 mM	NaCl
	80 mM	EDTA pH 8,0
	50 mM	Tris/HCl pH 8,0
	0,2 %	SDS
Lysispuffer	750 µl	MMTB-Puffer
	35 µl	Proteinase K (10 mg/ml)

4.9.4. Isolierung von Phagen-DNA

Zur Isolierung von Phagen-DNA wurden je Klon 2 Agaroseplatten (145 mm) mit 10^5 Pfu ausplattiert. Die durchlysierten Platten wurden mit je 20 ml SM-Puffer überschichtet und 4 Stunden bei 4 °C geschwenkt, nach 3 Stunden wurden 2 Tropfen Chloroform zugegeben. Die λ -Phagenextrakte wurden durch Zentrifugation von Agaroseresten befreit, mit 25 μ l DNaseI (10 mg/ml) und 100 μ l RNaseA (10 mg/ml) versetzt und 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. In einer Ultrazentrifuge (Beckman) wurde die Phagen-DNA bei 28.000 Upm (SW28-Rotor) innerhalb von 2 Stunden pelletiert und anschließend in 600 μ l 50 mM Tris/HCl pH 8,0 resuspendiert. Hierfür und in allen folgenden Schritten wurden abgeschnittene blaue Spitzen verwendet, um eine Scherung der DNA zu vermeiden. Nach Aufreinigung der DNA durch Phenol- und Phenol-Chloroform Extraktion wurde die Phagen-DNA mit 2 μ l RNaseA (10 mg/ml) versetzt und 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Es folgten zwei Phenol-Chloroform Extraktionen und eine Chloroform Extraktion. Die aufgereinigte DNA wurde mit Ethanol gefällt, gewaschen und in 200 μ l TE resuspendiert. Phagen-DNA wurde bei 4 °C gelagert.

Phagenagarose	1,5 %	Agarose
	0,3 %	Glucose
	75 mM	CaCl ₂
	4 μ M	Fe ₂ (SO ₄) ₃
	2 mM	MgSO ₄

4.9.5. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren in Lösung

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260$ nm bestimmt. Dazu wurden die Nukleinsäuren in der Regel 1:200 in Wasser verdünnt. Dabei entsprachen:

1 OD ₂₆₀ = 50 μ g /ml	für doppelsträngige DNA
1 OD ₂₆₀ = 40 μ g /ml	für einzelsträngige DNA oder RNA

4.9.6. Restriktionsendonukleaseverdau

Zu analytischen Zwecken wurde 1 µg Plasmid-DNA mit 1 U Restriktionsendonuklease in dem vom Hersteller mitgelieferten Puffer in 15 µl Gesamtvolumen für 1 Stunde bei 37 °C verdaut. Für präparative Zwecke wurden 5-10 µg Plasmid-DNA in einem 50 µl Ansatz 2 Stunden verdaut. Die zugegebene Menge der Restriktionsendonuklease wurde dem Maßstab des Verdaus angepaßt, war jedoch nie größer als 10 % des Gesamtvolumens. Somit wurde sichergestellt, daß die Enzymaktivität nicht durch eine zu hohe Glycerolkonzentration gehemmt wurde.

4.9.7. Konversion überhängender DNA-Enden

Da es in einigen Fällen nicht möglich war, den Vektor und das DNA-Fragment (Insert) mit komplementären, überhängenden Enden zu generieren, mußten Enden ohne Überhang erzeugt werden. Dabei wurden 5' Überhänge durch eine Auffüllreaktion, 3' Überhänge durch eine Abbaureaktion konvertiert. Hierzu wurde die Plasmid-DNA nach dem Restriktionsverdau aufgereinigt (4.9.9) und in 86 µl Wasser aufgenommen. Anschließend wurden 10 µl T4 DNA-Polymerase-Puffer, 1 µl dNTP-Mix (10 mM), 1 µl BSA (5 mg/ml) und 2 µl T4-DNA-Polymerase (3 U/µl, New England Biolabs) zugegeben. Der Ansatz wurde 30 Minuten bei 12 °C und dann für 10 Minuten bei 70 °C inkubiert, aufgereinigt und anschließend zur Ligation eingesetzt.

4.9.8. Dephosphorylierung von 5' Enden der DNA

Um eine Religation des Vektors und damit den nichtrekombinanten Hintergrund zu verringern, wurde der zur Religation notwendige 5' Phosphatrest des Vektors hydrolytisch abgespalten. Dazu wurde der Restriktionsansatz 15 Minuten vor Beendigung des Verdaus mit 0,5 µl Alkalischer Phosphatase aus Rinderdarm (CIP, 10 U/µl, New England Biolabs) versetzt. Im Anschluß daran wurde die Vektor-DNA vom Enzym mit Hilfe eines Qiaquick PCR Purification Kits (Qiagen) aufgereinigt.

4.9.9. Aufreinigung von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente wurden nach gelelektrophoretischer Auftrennung unter UV-Licht mit einem Skalpell aus Agarosegelen ausgeschnitten. Zur Aufreinigung aus dem Gel wurde der Qiaquick Gel Extraction Kit (Qiagen) verwendet. Wenn PCR-Produkte und von Restriktionsendonukleasen verdaute DNA nicht durch Gelelektrophorese von anderen DNA-Fragmenten getrennt werden mußten, wurde der PCR-Purification Kit der Firma Qiagen zur Aufreinigung verwendet.

4.9.10. Kinasierung von Oligodesoxynukleotiden

Oligodesoxynukleotide müssen kinasiert werden, bevor sie kloniert werden konnten. Dazu wurden je 1 µl komplementärer, einzelsträngiger Oligodesoxynukleotide (100 mM) mit 5 µl Kinasepuffer, 40 µl Wasser, 1 µl ATP (100 mM) und 2 µl T4-Polynukleotidkinase (10 U/µl, New England Biolabs) versetzt und 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Es folgte eine 10 minütige Denaturierung des Enzyms bei 95 °C und im Anschluß daran die langsame Abkühlung auf RT, um so doppelsträngige Oligodesoxynukleotide zu erhalten. 1 µl der dsOligodesoxynukleotide wurde zur Ligation eingesetzt.

4.9.11. Ligation

In 10 µl 1x Ligationspuffer (Takara) wurden 20-50 ng Vektor-DNA mit drei Äquivalenten DNA-Fragment versetzt. Der Ansatz wurde in Gegenwart von 0,5 µl T4-DNA-Ligase (2 Weiss-U/µl, Takara) 15 Minuten bei RT oder 12 Stunden bei 16 °C inkubiert.

4.9.12. Polymerasekettenreaktion (PCR)

(Saiki, *et al.*, 1986)

Zur Erzeugung von definierten DNA-Fragmenten zur Klonierung oder zur Amplifikation von revers transkribierter RNA (RT-PCR, RACE-PCR) wurde die Polymerasekettenreaktion verwendet. Der 50 µl Ansatz enthielt 50 ng Plasmid-DNA (bzw. 2 µl aus dem Ansatz einer

Reversen Transkription), je 10 pmol eines 5' und eines 3' Oligodesoxynukleotides (Primer), 1 µl dNTP-Mix (10 mM), 5 µl PCR-Puffer und 1 U Taq-Polymerase. Der Ansatz wurde auf 95 °C erhitzt und nach 2 Minuten bei 95 °C wurde folgendes Programm mit 30-35 Zyklen gestartet:

Denaturierung	15 Sekunden 95 °C
Primer-Anlagerung	20 Sekunden 50-60 °C (je nach Primer)
Taq-Polymerase-Reaktion	60 Sekunden 72 °C (ca. 1 Minute/1000 nt Produkt)

Nach dem letzten Zyklus wurde der Reaktionsansatz für 5 Minuten bei 72 °C inkubiert. Je 5 µl eines Ansatzes wurden durch Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

4.9.13. Herstellung radioaktiv markierter Sonden

Zur Hybridisierung von Southernblots (4.1.2) wurden radioaktiv markierte DNA-Fragmente benötigt. Die radioaktive Markierung erfolgte unter Verwendung des Megaprime Labelling Kits (Amersham Pharmacia Biotech). Dabei dienen Zufallsnukleotide (Nonamere) als Startermolekül für eine durch das große Fragment der DNA-PolymeraseI (Klenow-Fragment) katalysierte DNA-Synthese. Neben dATP, dGTP und dTTP wurde [$\alpha^{32}\text{P}$]dCTP (10 mCi/ml, 3000 Ci/mmol, Amersham Pharmacia Biotech) eingesetzt. Die Markierung wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Bestimmung der spezifischen Aktivität des gereinigten, radioaktiv markierten DNA-Fragments erfolgte durch Cerencov-Zählung. Vor dem Einsatz der Sonde wurde diese 5 Minuten bei 95 °C denaturiert.

4.9.14. Radioaktive Markierung von Oligodesoxynukleotiden

4.9.14.1. Kinasierung von Einzelstrang-Oligodesoxynukleotiden

Oligodesoxynukleotide wurden in einer Kinasierungsreaktion in Anwesenheit von [$\gamma^{32}\text{P}$]ATP radioaktiv markiert. Dazu wurden 20 pmol des Oligodesoxynukleotids in 36 µl Wasser mit 5 µl 10x Kinase Puffer (von New England Biolabs mitgeliefert), 2 µl T4-Polynukleotidkinase

(10 U/ μ l, New England Biolabs) und 6 μ l [γ^{32} P]ATP (10 mCi/ml, 3000 Ci/mmol, Amersham Pharmacia Biotech) versetzt. Der Ansatz wurde 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Oligodesoxynukleotide mit dem Nucleotide Removal Kit von Qiagen aufgereinigt und mit 100 μ l TE eluiert. 2 μ l des Eluats wurden im Szintillationszähler nach Cerenkov vermessen.

4.9.14.2. Radioaktive Auffüllreaktion von Doppelstrang Oligodesoxynukleotiden

Zur Herstellung von Doppelstrang (ds) Oligodesoxynukleotiden wurden je 1 nmol komplementärer, einzelsträngiger Oligodesoxynukleotide in 200 μ l Primerpuffer für 10 Minuten bei 95 °C denaturiert, und im Anschluß daran langsam auf RT abgekühlt. Von diesem Ansatz wurden 10 μ l mit 3 μ l 10x Primerpuffer, 33 μ l Wasser, 1 μ l dNTP-Mix ohne dCTP (25 mM), 1 μ l Klenow-Fragment (4 U/ μ l, New England Biolabs) und 2 μ l [α^{32} P]dCTP (10 mCi/ml, 3000 Ci/mmol, Amersham Pharmacia Biotech) versetzt und 15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Aufreinigung erfolgte mit dem Nucleotide Removal Kit der Firma Qiagen, das Elutionsvolumen betrug 300 μ l .

10x Primerpuffer	500 mM	Tris/HCl pH 8,0
	500 mM	NaCl
	100 mM	MgCl ₂

4.9.15. Gelretardierungsanalyse

Für Gelretardierungsexperimente wurden 15 μ g Kernextrakt (4.11.3) in einem Gesamtvolumen von 20 μ l mit 2 μ l Kompetitor (dsOligodesoxynukleotid vor der radioaktiven Markierung, siehe (4.1.14.2)) und 40.000 cpm des radioaktiv markierten dsOligodesoxynukleotids (4.1.14.2) in BS-Puffer gemischt. Zur Vermeidung unspezifischer Bindung wurde dem Ansatz 1 μ g poly(dI*dC) hinzugefügt. Nach 30 minütiger Inkubation bei RT wurden DNA/Protein Komplexe in einem nativen Gel (4.1.3) abgetrennt.

BS-Puffer	20 mM	Tris/HCl pH 8,0
	50 mM	KCl
	0,2 mM	ZnSO ₄
	3 %	Glycerol

4.10. RNA

Das Arbeiten mit RNA erfordert besondere Vorsichtsmaßnahmen zum Schutz vor RNase-Kontaminationen. Deshalb wurden ausschließlich autoklavierte oder für mindestens 3 Stunden bei 180 °C hitzesterilisierte Geräte verwendet. Lösungen wurden mit Wasser angesetzt, welches zuvor mit DEPC (Diethylpyrocarbonat) behandelt worden war (0,1 % DEPC, mehrere Stunden bei RT gerührt, autoklaviert).

4.10.1. Isolierung von RNA

(Chomczynski und Sacchi, 1987)

Gesamt-RNA wurde mit dem RNeasy Kit der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers isoliert. Zur Qualitätskontrolle wurde 1 µg der RNA im Agarosegel aufgetrennt und unter UV-Licht beurteilt.

4.10.2. Primer Extension

Zum Auffinden von Transkriptionsstartstellen der mRNA wurde ein zur mRNA komplementäres Oligodesoxynukleotid radioaktiv markiert. 100 µg Gesamt-RNA wurden mit 5 µl des radioaktiv markierten Oligodesoxynukleotids versetzt und mit Wasser auf 22,6 µl aufgefüllt. Dazu wurden 2,4 µl PE-Puffer pipettiert. Dieser Ansatz wurde 15 Minuten bei 60 °C inkubiert und anschließend langsam auf 42 °C abgekühlt. Danach wurden diesem Ansatz 8 µl Erststrangpuffer (Life Technologies), 2 µl dNTP-Mix (10 mM), 4 µl DTT (100 mM), 1 µl RNasin (30 U/µl, Promega) und 1 µl SuperscriptTMII RT (200 U/µl, Life Technologies) zugesetzt. Nach 30 minütiger Inkubation bei 42 °C wurden nochmals 0,5 µl SuperscriptTMII RT zugegeben, der Ansatz wurde weitere 30 Minuten bei 42 °C inkubiert.

Nach Zugabe von 1 µl 0,5 M EDTA und 1 µl RNase A (500 µg /ml, Roche) folgte eine 30 minütige Inkubation bei 37 °C. Anschließend wurden 160 µl Wasser und 200 µl Phenol/Choloroform im Verhältnis 1:1 zugegeben, gut gemischt und zur Phasentrennung zentrifugiert. Die obere, wäßrige Phase wurde mit 0,1 Volumen 3 M NaOAc pH 4,8 und 2,5 Volumen Ethanol versetzt und auf Trockeneis inkubiert. Die so gefällten Nukleinsäuren wurden pelletiert, mit 70 % Ethanol gewaschen und getrocknet. Das Pellet wurde in 7 µl Wasser resuspendiert, mit 5 µl Stoppuffer (aus T7 SequencingTM Kit, Pharmacia) versetzt und 5 Minuten bei 95 °C denaturiert. Die Hälfte dieses Ansatzes wurde auf ein 6 % denaturierendes Polyacrylamidgel aufgetragen. Zur Ermittlung der Startstellen wurde ein radioaktiv markierter DNA-Standard direkt neben der Probe aufgetragen.

PE-Puffer	100 mM	NaCl
	20 mM	Tris/HCl pH 8,3
	0,1 mM	EDTA

4.10.3. Reverse Transkription

Für die reverse Transkription wurden 4,5 µg Gesamt-RNA mit 3,3 µl Erststrangpuffer (Life Technologies) und 0,5 µl DNaseI (Roche) in 25 µl Volumen für 20 Minuten bei 25 °C inkubiert. Die Reaktion wurde mit 0,8 µl EDTA (75 mM) gestoppt. Nach Zugabe von 2 µl Zufallshexanukleotid (200 ng/µl, Roche) wurde dieser Ansatz für 10 Minuten bei 70 °C inkubiert und dann auf 4 °C abgekühlt. Je 12,5 µl des Reaktionsansatzes wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 2,5 µl Erststrangpuffer, 0,5 µl MgCl₂ (56 mM), 2,0 µl DTT (100 mM), 0,5 µl RNasin (30 U/µl, Promega) und 1 µl dNTP-Mix gemischt. Nach einer zweiminütigen Inkubation bei 37 °C wurde einem der beiden identischen Ansätze 1 µl SuperscriptTM II RT (200 U/µl, Life Technologies) zugefügt, beide Ansätze wurden ansonsten gleich behandelt. Nach einer einstündigen Inkubation bei 49 °C wurde die Reverse Transkriptase durch eine 15 minütige Inkubation bei 70 °C inaktiviert. Anschließend wurde 1 µl RNase H (2 U/µl, Takara) zugesetzt und 20 Minuten bei 37 °C inkubiert um die RNA aus dem Ansatz zu entfernen.

4.10.4. Verankerte Polymerasekettenreaktion (RACE-PCR)

(Schuster, *et al.*, 1992)

Diese Methode wurde zum Auffinden von 5' Enden von mRNA verwendet. Dazu wurde eine cDNA generiert (4.10.3), aufgereinigt (4.9.9) und mit 53 µl Wasser eluiert. Nach Zugabe von 15 µl TdT-Puffer (Promega), 7,5 µl dATP (10 mM) und 1,5 µl Terminaler Transferase (19 U/µl, Promega) wurde der Ansatz 30 Minuten bei 37 °C und anschließend für 10 Minuten bei 70 °C inkubiert. Der Ansatz wurde mit TE auf 100 µl aufgefüllt; 1 µl davon wurde in eine PCR-Reaktion (4.9.12) eingesetzt.

4.11. Proteine

4.11.1. Proteinbestimmung

(Bradford, 1976)

Das Testprinzip dieser Methode basiert darauf, daß sich in saurer Lösung bei der Bindung von Coomassie Brilliant Blue G-250 an Proteine das Absorptionsmaximum des Farbstoffs von 465 nm nach 595 nm verschiebt.

Die Proteinproben wurden so verdünnt, daß sich 1-10 µg Protein in 800 µl Wasser befand. Außerdem wurde BSA als Kontrollstandard in verschiedenen Konzentrationen angesetzt (0,5-15 µg/800 µl). Die BSA-Standards und die Proben wurden mit 200 µl Bradford-Farbstofflösung versetzt und 15 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 595 nm gemessen.

Bradford-Farbstofflösung	100 mg	Serva Blue G
	50 ml	Ethanol
	100 ml	Phosphorsäure
	50 ml	Wasser
		Lagerung bei 4 °C

4.11.2. Präparation von Gesamtzellproteinextrakten

Adhärent wachsende Zellen wurden einmal mit kaltem PBS gewaschen und dann in 1,5 ml PBS abgeschabt. Die Zellen wurden sedimentiert (Mikrofuge, 2000 Upm, 4 °C, 5 Minuten) und das Pellet in 50 µl Extrakt-Puffer resuspendiert. Die Zellsuspension wurde 5 Minuten auf Eis inkubiert (Lyse), anschließend wurden die unlöslichen Zellbestandteile durch eine Zentrifugation (Mikrofuge, 13000 Upm, 4 °C, 15 Minuten) pelletiert. Vom Überstand wurden 2 µl zur Proteinbestimmung entnommen; der restliche Extrakt wurde mit gleichem Volumen 2x SDS-Probenpuffer versetzt, 5 Minuten bei 95 °C denaturiert und bei -20 °C gelagert.

WCE-Puffer	50 mM	HEPES pH 7,8
	20 mM	NaF
	1 mM	Na ₃ VO ₄
	1 mM	Na ₂ MoO ₄
	450 mM	NaCl
	0,2 mM	EDTA
	25 %	Glycerol
		Lagerung bei -20 °C
Extrakt-Puffer	50 µg /ml	Aprotinin (Sigma)
	50 µg /ml	Leupeptin (Sigma)
	0,5 mM	PMSF (Sigma)
	1 mM	DTT (Life Technologies)
	1 %	Nonidet P 40 in WCE-Puffer

4.11.3. Präparation von Kernextrakten

10⁷ Zellen wurden trypsiniert, pelletiert, in 1,5 ml kaltem PBS resuspendiert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach der Zentrifugation für 10 Sekunden bei 5000 Upm wurde das Zellpellet in 400 µl Puffer A resuspendiert und 10 Minuten auf Eis inkubiert. 10-15 Sekunden vortexen führte zum Aufbrechen der Zellen. Die Zellkerne wurden pelletiert (10 Sekunden, 13000 Upm), in 100 µl kaltem Puffer C resuspendiert, 20 Minuten auf Eis inkubiert und erneut pelletiert (2 Minuten bei 4 °C und 13000 Upm). Anschließend wurde

die Proteinkonzentration des Überstands bestimmt (4.11.1); die Lagerung der Kernextrakte erfolgte bei -80 °C.

Puffer A	10 mM	HEPES pH 7,9
	1,5 mM	MgCl ₂
	2 mM	KCl
		Proteaseinhibitoren
Puffer C	20 mM	HEPES pH 7,9
	1,5 mM	MgCl ₂
	25 %	Glycerol
	420 mM	NaCl
	0,2 mM	EDTA
		Proteaseinhibitoren
Proteaseinhibitoren	0,5 mM	DTT
	0,2 mM	PMSF
	5 µg /ml	Pepstatin A
	50 ng/ml	Leupeptin
	0,1 µg /ml	Aprotinin

4.12. Zellkultur

4.12.1. Zelllinien

Die verwendeten Zelllinien entstammen humanen Tumoren (Ausnahme: NIH 3T3).

Zelllinie	Ursprung	Kulturmedium
RDES	Ewingsarkom	RPMI 1640, 15 % FBS, Penicillin/Streptomycin,
Sal2	Neuroepitheliom	RPMI 1640, 10 % FBS, Penicillin/Streptomycin,
StaEt1	Ewingsarkom	RPMI 1640, 10 % FBS Penicillin/Streptomycin,
HeLa	Zervixkarzinom	DMEM, 10 % FBS, Penicillin/Streptomycin,
NIH3T3	Murine Fibroblasten	DMEM, 10 % FBS, Penicillin/Streptomycin,
ND7	neuronal, Fusion	DMEM, 10 % FBS, Penicillin/Streptomycin,

Tab. 4.2 Verwendete Zelllinien

4.12.2. Medien und Lösungen

DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle's Medium, pH 7,0 mit 4,5 % Glucose und Glutamin (Life Technologies)	
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium, pH 7,0 mit Glutamin (Life Technologies)	
FBS	Fötales Bovines Serum (Life Technologies), wurde einmalig vor Gebrauch für 30 Minuten bei 56 °C hitzeinaktiviert	
Trypsin/EDTA	0,5 % Trypsin 0,02 % EDTA in PBS ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$	
Penicillin/ Streptomycin	10.000 U Penicillin 10 µg/ml Streptomycin	

4.12.3. Beschichtung von Gewebekulturplatten

Einige der verwendeten Zelllinien (RDES, Sal2, StaEt1) wuchsen auf unbeschichteten Gewebekulturschalen als Zellhaufen in semiadhärenter Weise, welches Passagieren und Experimente erschwerte. Daher wurden die Kulturschalen für die entsprechenden Zelllinien mit 0,2 % Gelatine in Wasser beschichtet. Nach einer minimalen Beschichtungsdauer von 30 Minuten wurde die Gelatine-Lösung abgesaugt. Die Platten konnten über Monate bei RT gelagert werden.

4.12.4. Kultivierung

Alle eukaryotischen Zelllinien wurden in Brutschränken bei 37 °C unter Begasung mit 5 % CO_2 in wassergesättigter Atmosphäre kultiviert. Die Arbeiten wurden ausnahmslos unter einer Sterilbank durchgeführt. Sämtliche Geräte und Lösungen wurden vor Benutzung sterilisiert.

4.12.5. Passagieren von Zellen

Die verwendeten Zelllinien wuchsen adhärent. Zum Passagieren wurde das Kulturmedium vollständig abgesaugt. Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen, mit einer Trypsin/-ETDA-Lösung überschichtet und für 2 bis 10 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Wirkung des Trypsins wurde durch Zugabe des gleichen Volumens Kulturmedium gestoppt. Für einige Experimente wurde eine bestimmte Zelldichte benötigt; hierfür wurde die Zellzahl mit einer Neubauer Zählkammer ermittelt.

4.12.6. Einfrieren und Auftauen von Zellen

Die Zellen einer 150 mm Schale wurden durch eine Trypsin-Behandlung abgelöst, bei 1000 Upm pelletiert und in 3 ml Einfriermedium A aufgenommen. Anschließend wurde das gleiche Volumen Einfriermedium B langsam zugegeben. Je 1 ml der Zellsuspension wurde in Kryoröhrchen bei -80 °C eingefroren und nach einem Tag in flüssigem Stickstoff gelagert.

Einfriermedium A	40 %	FBS in Medium
------------------	------	---------------

Einfriermedium B	20 %	DMSO in Medium
------------------	------	----------------

Zum Auftauen wurden die Kryoröhrchen aus dem flüssigen Stickstoff in Trockeneis überführt und im Wasserbad bei 37 °C erwärmt, bis die Zellsuspension gerade aufgetaut war. Die Zellen wurden in Kulturmedium überführt und zentrifugiert. Das Pellet wurde in Kulturmedium resuspendiert und auf einer 10 cm Schale ausgesät.

4.12.7. Elektroporation von Zellen

Bei dieser Methode liegen Zellsuspension und Plasmid-DNA nebeneinander in einer Kunststoffküvette vor. An den beiden Seiten der Küvette befinden sich zwei Metallplatten, die einen Plattenkondensator bilden. Am Gerät (BioRad) sind Spannung und Kapazität des Kondensators wählbar. Die einzustellende Kapazität ist abhängig von dem Flüssigkeitsvolumen in der Küvette. Die optimale Spannung muß für jede Zelllinie experimentell ermittelt

werden. Für die Transfektionseffizienz sind zwei gegenläufige Effekte von Bedeutung. So ist die Transfektionsrate bei hohen Spannungen höher, das bedeutet, die Anzahl an Zellen, die die Plasmid-DNA aufgenommen haben, ist größer. Andererseits ist die Überlebensrate der Zellen geringer.

Für die Elektroporation von StaEt1 Zellen wurden 5×10^6 Zellen je Ansatz verwendet (ebenfalls 5×10^6 Zellen von Sal2 und RDES). Die Zellen, in 200 μ l RPMI, wurden in eine sterile Küvette pipettiert und wenige Minuten auf Eis gekühlt. Direkt vor der Elektroporation wurden 5-10 μ g Plasmid-DNA zugegeben. Sollten die Zellen stabil transfiziert werden, wurden 20 μ g linearisierte Plasmid-DNA verwendet, um eine Integration in das Genom der Zellen zu erleichtern. Die Elektroporation wurde bei 500 μ F und 180-260 V durchgeführt. Nach der Elektroporation wurde 1 ml Kulturmedium zugegeben und die Zellen vorsichtig (!) in eine 3,5 cm Schale überführt, für 28 Stunden kultiviert und anschließend für den Reportergentest geerntet. Alternativ wurden die Zellen auf 10 cm Schalen ausplattiert, um daraus Proteine zu isolieren oder stabile Transfektanten zu etablieren.

4.12.8. Messung von Reportergenaktivitäten (Luziferase)

Der Zellrasen wurde mit kaltem PBS gewaschen, 5 Minuten auf Eis mit 100 μ l Lysispuffer inkubiert und bei 13.000 Upm in einer gekühlten Tischzentrifuge pelletiert. Der Überstand wurde zur Bestimmung der Luziferaseaktivität verwendet. Hierfür wurde ein Luminometer der Fa. Berthold benutzt. 10 μ l des Überstandes wurden in einem geeigneten Polycarbonatröhrchen (Sarstedt) vorgelegt. Vom Luminometer wurden 100 μ l Luziferinlösung injiziert. Die relativen Lichteinheiten (RLU) wurden über einer Meßzeit von 10 Sekunden integriert.

Luziferasepuffer	100 mM	Tris/Acetate pH 7,8
	10 mM	Magnesiumacetat
	1 mM	EDTA
	1 mM	EGTA

Lysispuffer	1 %	Triton X-100
	1 mM	DTT
		in Luziferasepuffer
Luziferinlösung	66 µM	Luziferin (Sigma)
	2 mM	ATP
	1 mM	DTT
		in Luziferasepuffer

5. Zusammenfassung

Bei den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Proteinen Brn-3a(l) und Brn-3a(k) handelt es sich um POU Transkriptionsfaktoren, die während der Embryogenese zeitlich limitiert in neuronalen Zellen exprimiert werden. Beide Proteine werden von einem Gen kodiert und unterscheiden sich nur im N-Terminus. Sowohl Brn-3a(l) als auch Brn-3a(k) sind transkriptionelle Aktivatoren, unterscheiden sich jedoch in ihrem onkogenen Potential. Im Gegensatz zu Brn-3a(k) ist Brn-3a(l) ein Protoonkogen. Bei der Brn-3a(l) induzierten Transformation von Zellen wirkt Brn-3a(k) sogar als Antagonist von Brn-3a(l).

Zunächst wurde der 5' Bereich des humanen Brn-3a Gens isoliert und sequenziert. Durch Primer Extension Experimente konnten vier Transkriptionsstartstellen direkt vor dem Translationsinitiationskodon von Brn-3a(l) lokalisiert werden. Im Falle des Brn-3a(l) Promotors handelt sich um einen TATA-losten Promotor, der zwei Basalpromotorelemente besitzt. Desweiteren wurde der 5' Bereich von Brn-3a(l) durch Reportergenexperimente funktionell charakterisiert.

Der Promotor von Brn-3a(k) wurde im Intron von Brn-3a(l) lokalisiert. Es handelt sich hierbei um einen Null-Promotor, der mehrere Transkriptionsstartstellen und keine Basalpromotorelemente enthält. Die Brn-3a(k) Transkription wird durch ein DNA-Repressorelement reguliert. Es wurde eine 24 Nukleotide umfassende Sequenz, S24, identifiziert. An diese findet spezifisch Proteinbindung statt, und sie ist essentiell für die Repression der Transkription von Brn-3a(k). Weiter upstream gelegen befindet sich ein zweiter DNA-Abschnitt, der die reprimierende Wirkung von S24 verstärkt. Bei dem DNA-Element S24 handelt es sich um einen klassischen Silencer, der auf heterologe Promotoren wirkt. Er hat jedoch nur einen geringen Einfluß auf die Transkription von Brn-3a(l). Der Promotor von Brn-3a(l) wirkt dominant und reprimiert somit den Promotor von Brn-3a(k), so daß Transkription von Brn-3a(k) nur dann stattfindet, wenn der Brn-3a(l) Promotor inaktiv ist. Neben der transkriptionellen Regulation des Brn-3a Gens wurden auch seine Effektorgene analysiert. Dazu wurden induzierbare Brn-3a(l) Zelllinien hergestellt, um mit Hilfe einer DNA-Array-Analyse Zielgene von Brn-3a(l) zu finden. Hierbei wurden mehrere potentielle Zielgene von Brn-3a(l) identifiziert.

6. Literaturverzeichnis

Amati B. und Land H. (1994),

Myc-Max-Mad: a transcription factor network controlling cell cycle progression, differentiation and death,

Curr Opin Genet Dev 4, 102-8.

Aurora R. und Herr W. (1992),

Segments of the POU domain influence one another's DNA-binding specificity,

Mol Cell Biol 12, 455-67.

Ausubel F.M. Brent R. Kingston R.E. Moore D.D. Seidman J.G. Smith J.A. und Struhl K. (1987),

Current Protocols in Molecular Biology,
Wiley Interscience.

Ayer D.E. Kretzner L. und Eisenman R.N. (1993),

Mad: a heterodimeric partner for Max that antagonizes Myc transcriptional activity,
Cell 72, 211-22.

Beato M. (1989),

Gene regulation by steroid hormones,
Cell 56, 335-44.

Beyersmann D. (2000),

Regulation of mammalian gene expression,
Exs 89, 11-28.

Blackwood E.M. und Eisenman R.N. (1991),

Max: a helix-loop-helix zipper protein that forms a sequence-specific DNA-binding complex with Myc,
Science 251, 1211-7.

Blackwood E.M. Luscher B. Kretzner L. und Eisenman R.N. (1991),

The Myc:Max protein complex and cell growth regulation,
Cold Spring Harb Symp Quant Biol 56, 109-17.

Bouchard M. Pfeffer P. und Busslinger M. (2000),

Functional equivalence of the transcription factors Pax2 and Pax5 in mouse development,
Development 127, 3703-13.

Bradford M.M. (1976),

A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding,
Anal Biochem 72, 248-54.

Budhram-Mahadeo V. Morris P.J. Lakin N.D. Dawson S.J. und Latchman D.S. (1996),

The different activities of the two activation domains of the Brn-3a transcription factor are dependent on the context of the binding site,
J Biol Chem 271, 9108-13.

Budhram-Mahadeo V. Morris P.J. Lakin N.D. Theil T. Ching G.Y., *et al.* (1995),

Activation of the alpha-internexin promoter by the Brn-3a transcription factor is dependent on the N-terminal region of the protein,
J Biol Chem 270, 2853-8.

Budhram-Mahadeo V. Morris P.J. Smith M.D. Midgley C.A. Boxer L.M., *et al.* (1999),

p53 suppresses the activation of the Bcl-2 promoter by the Brn-3a POU family transcription factor,
J Biol Chem 274, 15237-44.

Chomczynski P. und Sacchi N. (1987),

Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate- phenol-chloroform extraction,
Anal Biochem 162, 156-9.

Clark A.R. und Docherty K. (1993),

Negative regulation of transcription in eukaryotes,
Biochem J 296, 521-41.

Collum R.G. Fisher P.E. Datta M. Mellis S. Thiele C., *et al.* (1992),

A novel POU homeodomain gene specifically expressed in cells of the developing mammalian nervous system,
Nucleic Acids Res 20, 4919-25.

Dawson S.J. Liu Y.Z. Rodel B. Moroy T. und Latchman D.S. (1996),

The ability of POU family transcription factors to activate or repress gene expression is dependent on the spacing and context of their specific response elements,
Biochem J 314, 439-43.

Dawson S.J. Palmer R.D. Morris P.J. und Latchman D.S. (1998),

Functional role of position 22 in the homeodomain of Brn-3 transcription factors,
Neuroreport 9, 2305-9.

Ensor E. Smith M.D. und Latchman D.S. (2001),

The brn-3a transcription factor protects sensory but not sympathetic neurons from programmed cell death/apoptosis,
J Biol Chem 276, 5204-12.

Ewing B. und Green P. (2000),

Analysis of expressed sequence tags indicates 35,000 human genes,
Nat Genet 25, 232-4.

Gossen M. und Bujard H. (1992),

Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline- responsive promoters,
Proc Natl Acad Sci U S A 89, 5547-51.

Greenblatt J. (1997),

RNA polymerase II holoenzyme and transcriptional regulation,
Curr Opin Cell Biol 9, 310-9.

Guillemot F. (1999),

Vertebrate bHLH genes and the determination of neuronal fates,
Exp Cell Res 253, 357-64.

Hampsey M. (1998),

Molecular genetics of the RNA polymerase II general transcriptional machinery, *Microbiol Mol Biol Rev* 62, 465-503.

He X. Treacy M.N. Simmons D.M. Ingraham H.A. Swanson L.W., *et al.* (1989),

Expression of a large family of POU-domain regulatory genes in mammalian brain development,
Nature 340, 35-41.

Herbomel P. (1990),

Synergistic activation of eukaryotic transcription: the multiacceptor target hypothesis,
New Biol 2, 1063-70.

Herr W. und Cleary M.A. (1995),

The POU domain: versatility in transcriptional regulation by a flexible two-in-one DNA-binding domain,
Genes Dev 9, 1679-93.

Ioshikhes I. Trifonov E.N. und Zhang M.Q. (1999),

Periodical distribution of transcription factor sites in promoter regions and connection with chromatin structure,
Proc Natl Acad Sci U S A 96, 2891-5.

Itoh F. Nakane T. und Chiba S. (1997),

Gene expression of MASH-1, MATH-1, neuroD and NSCL-2, basic helix-loop- helix proteins, during neural differentiation in P19 embryonal carcinoma cells,
Tohoku J Exp Med 182, 327-36.

Kim T.K. und Maniatis T. (1997),

The mechanism of transcriptional synergy of an in vitro assembled interferon-beta enhanceosome,
Mol Cell 1, 119-29.

Klemm J.D. Rould M.A. Aurora R. Herr W. und Pabo C.O. (1994),

Crystal structure of the Oct-1 POU domain bound to an octamer site: DNA recognition with tethered DNA-binding modules,
Cell 77, 21-32.

Laemmli U.K. (1970),

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4,
Nature 227, 680-5.

Lee T.I. und Young R.A. (1998),

Regulation of gene expression by TBP-associated proteins,
Genes Dev 12, 1398-408.

Liu Y.Z. Dawson S.J. und Latchman D.S. (1996),

Alternative splicing of the Brn-3a and Brn-3b transcription factor RNAs is regulated in neuronal cells,

J Mol Neurosci 7, 77-85.

Maldonado E. und Reinberg D. (1995),

News on initiation and elongation of transcription by RNA polymerase II,

Curr Opin Cell Biol 7, 352-61.

McEvelly R.J. Erkman L. Luo L. Sawchenko P.E. Ryan A.F., *et al.* (1996),

Requirement for Brn-3.0 in differentiation and survival of sensory and motor neurons,

Nature 384, 574-7.

McEvelly R.J. und Rosenfeld M.G. (1999),

The role of POU domain proteins in the regulation of mammalian pituitary and nervous system development,

Prog Nucleic Acid Res Mol Biol 63, 223-55.

Mitchell P.J. und Tjian R. (1989),

Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins,

Science 245, 371-8.

Morris P.J. Dawson S.J. Wilson M.C. und Latchman D.S. (1997),

A single residue within the homeodomain of the Brn-3 POU family transcription factors determines whether they activate or repress the SNAP-25 promoter,

Neuroreport 8, 2041-5.

Nelson H.C. (1995),

Structure and function of DNA-binding proteins,

Curr Opin Genet Dev 5, 180-9.

Ninkina N.N. Stevens G.E. Wood J.N. und Richardson W.D. (1993),

A novel Brn3-like POU transcription factor expressed in subsets of rat sensory and spinal cord neurons,

Nucleic Acids Res 21, 3175-82.

Ogbourne S. und Antalis T.M. (1998),

Transcriptional control and the role of silencers in transcriptional regulation in eukaryotes,

Biochem J 331, 1-14.

Orphanides G. Lagrange T. und Reinberg D. (1996),

The general transcription factors of RNA polymerase II,
Genes Dev 10, 2657-83.

Phillips K. und Luisi B. (2000),

The virtuoso of versatility: POU proteins that flex to fit,
J Mol Biol 302, 1023-39.

Rachez C. und Freedman L.P. (2001),

Mediator complexes and transcription,
Curr Opin Cell Biol 13, 274-80.

Roberts S.G. (2000),

Mechanisms of action of transcription activation and repression domains,
Cell Mol Life Sci 57, 1149-60.

Roest Crollius H. Jaillon O. Bernot A. Dasilva C. Bouneau L., *et al.* (2000),

Estimate of human gene number provided by genome-wide analysis using Tetraodon nigroviridis DNA sequence,
Nat Genet 25, 235-8.

Ruvkun G. und Finney M. (1991),

Regulation of transcription and cell identity by POU domain proteins,
Cell 64, 475-8.

Ryan A.K. und Rosenfeld M.G. (1997),

POU domain family values: flexibility, partnerships, and developmental codes,
Genes Dev 11, 1207-25.

Saiki R.K. Bugawan T.L. Horn G.T. Mullis K.B. und Erlich H.A. (1986),

Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes,
Nature 324, 163-6.

Sambrook J. Fritsch E.F. und Maniatis T. (1989),

Molecular cloning,
CSH-Laboratory Press.

Schonemann M.D. Ryan A.K. Erkman L. McEvilly R.J. Bermingham J., *et al.* (1998),
POU domain factors in neural development,
Adv Exp Med Biol 449, 39-53.

Schuster H. Rauh G. Muller S. Keller C. Wolfram G., *et al.* (1992),
Allele-specific and asymmetric polymerase chain reaction amplification in combination: a one
step polymerase chain reaction protocol for rapid diagnosis of familial defective apolipoprotein
B-100,
Anal Biochem 204, 22-5.

Scotting P.J. und Rex M. (1996),
Transcription factors in early development of the central nervous system,
Neuropathol Appl Neurobiol 22, 469-81.

Shillitoe E.J. und Noonan S. (2000),
Strength and specificity of different gene promoters in oral cancer cells,
Oral Oncol 36, 214-20.

Smale S.T. (1997),
Transcription initiation from TATA-less promoters within eukaryotic protein-coding genes,
Biochim Biophys Acta 1351, 73-88.

Smith M.D. Ensor E.A. Coffin R.S. Boxer L.M. und Latchman D.S. (1998),
Bcl-2 transcription from the proximal P2 promoter is activated in neuronal cells by the Brn-3a
POU family transcription factor,
J Biol Chem 273, 16715-22.

Southern E.M. (1975),
Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis,
J Mol Biol 98, 503-17.

Sturm R.A. und Herr W. (1988),
The POU domain is a bipartite DNA-binding structure,
Nature 336, 601-4.

Theil T. McLean-Hunter S. Zornig M. und Moroy T. (1993),

Mouse Brn-3 family of POU transcription factors: a new aminoterminal domain is crucial for the oncogenic activity of Brn-3a,

Nucleic Acids Res 21, 5921-9.

Tjian R. und Maniatis T. (1994),

Transcriptional activation: a complex puzzle with few easy pieces,

Cell 77, 5-8.

Tomilin A. Remenyi A. Lins K. Bak H. Leidel S., *et al.* (2000),

Synergism with the coactivator OBF-1 (OCA-B, BOB-1) is mediated by a specific POU dimer configuration,

Cell 103, 853-64.

Treacy M.N. He X. und Rosenfeld M.G. (1991),

I-POU: a POU-domain protein that inhibits neuron-specific gene activation,

Nature 350, 577-84.

Treacy M.N. und Rosenfeld M.G. (1992),

Expression of a family of POU-domain protein regulatory genes during development of the central nervous system,

Annu Rev Neurosci 15, 139-65.

Triezenberg S.J. (1995),

Structure and function of transcriptional activation domains,

Curr Opin Genet Dev 5, 190-6.

Verrijzer C.P. und Van der Vliet P.C. (1993),

POU domain transcription factors,

Biochim Biophys Acta 1173, 1-21.

Verrijzer C.P. van Oosterhout J.A. und van der Vliet P.C. (1992),

The Oct-1 POU domain mediates interactions between Oct-1 and other POU proteins,

Mol Cell Biol 12, 542-51.

Voss J.W. Wilson L. und Rosenfeld M.G. (1991),

POU-domain proteins Pit-1 and Oct-1 interact to form a heteromeric complex and can cooperate to induce expression of the prolactin promoter,
Genes Dev 5, 1309-20.

Wahls W.P. (1994),

RNA associated with a heterodimeric protein that activates a meiotic homologous recombination hot spot: RL/RT/PCR strategy for cloning any unknown RNA or DNA,
PCR Methods Appl 3, 272-7.

Wegner M. Drolet D.W. und Rosenfeld M.G. (1993),

POU-domain proteins: structure and function of developmental regulators,
Curr Opin Cell Biol 5, 488-98.

Xiang M. Gan L. Li D. Chen Z.Y. Zhou L., *et al.* (1997),

Essential role of POU-domain factor Brn-3c in auditory and vestibular hair cell development,
Proc Natl Acad Sci U S A 94, 9445-50.

Xiang M. Gan L. Zhou L. Klein W.H. und Nathans J. (1996),

Targeted deletion of the mouse POU domain gene Brn-3a causes selective loss of neurons in the brainstem and trigeminal ganglion, uncoordinated limb movement, and impaired suckling,
Proc Natl Acad Sci U S A 93, 11950-5.

Xiang M. Gao W.Q. Hasson T. und Shin J.J. (1998),

Requirement for Brn-3c in maturation and survival, but not in fate determination of inner ear hair cells,
Development 125, 3935-46.

Xiang M. Zhou L. Peng Y.W. Eddy R.L. Shows T.B., *et al.* (1993),

Brn-3b: a POU domain gene expressed in a subset of retinal ganglion cells,
Neuron 11, 689-701.

Danksagung

Mein allergrößter Dank gilt den Menschen, mit denen ich während der letzten Jahre einen großen Teil meiner Zeit verbracht habe, den gegenwärtigen und früheren Mitarbeitern der Arbeitsgruppe IV. Das besonders gute Arbeitsklima sorgte dafür, daß es mir immer Spaß machte im Labor zu arbeiten, auch wenn die Experimente gerade mal nicht so wollten wie ich.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Tarik Möröy für die Überlassung des Arbeitsplatzes sowie des Themas und vor allem dafür, daß seine Bürotür immer offen war für Fragen, Sorgen, Ergebnisse und Wünsche nach PCR-Maschinen.

Bei Eva Gau, Inge Spratte, Angelika Warda und Wojtek Wegrzyn möchte ich mich für die Hilfe im Labor bedanken. Bei Inge besonders für die vielen Kuchen und Kekse und bei Angelika für die Hilfe bei Kopfschmerzen und sonstigen Wehwehchen.

Petra Plessow und Tomas Civala danke ich für die hervorragende Fürsorge für die Mäuse. Im Zusammenhang mit den Mäusen gilt mein Dank auch und besonders Dr. Ralph Waldschütz und Dr. Branko Zevink, die die transgenen Mäuse generierten und dafür sorgten, daß sie sich nicht allzusehr vermehrten.

Nichts geht im Labor ohne Chemikalien und Geräte, deshalb ein Danke an Michael Derda, der immer wieder Bestellungen für mich bearbeitet hat, obwohl er mir oft wegen der Lieferscheine hinterherlaufen mußte, und an Hans Zieren, der immer wieder alles repariert hat, was kaputt ging.

Herrn PD Dr. Ludger Klein-Hitpaß verdanke ich die Array-Analysen in dieser Arbeit.

Nun zu meinem Banknachbarn Dr. Hanjo Hennemann, der meine Zentrifugen- und sonstigen Putzattacken und Aufforderungen zum Mitmachen ertragen mußte und ihnen immer widerstanden hat. Ohne ihn wären die letzten Jahre sicherlich weniger vergnüglich gewesen,

seinen besonderen Humor werde ich vermissen. Die Sätze 'Beate, es wundert mich, daß du so viele Freunde hast.' oder 'Du kannst ja auch nett sein!' werde ich wohl nie vergessen.

Christoph Geisen, meinem Mitstreiter im Kampf gegen das Laborchaos, ein ganz großes Dankeschön. Ihm verdanke ich auch meine Erfahrungen mit Aufstehen 'mitten in der Nacht'. Christoph gebührt meine aufrichtige Hochachtung dafür, daß er noch ehrgeiziger als ich war und dadurch zu Recht unseren Wettstreit gewonnen hat. Solch eine dumme Wette werde ich nie wieder abschließen!

Nicht vergessen möchte ich die Ehemaligen der AG IV, Dr. Thorsten Schmidt, den ich am Anfang ziemlich viel mit Fragen gequält habe, Dr. Holger Karsunky, der mein Singen im Labor nicht ertragen konnte, mir aber trotzdem gerne bei FACS-Analysen half und oft Vorschläge für weiterführende Experimente hatte, und natürlich bei Dr. Bernd Rödel, dessen große Hilfe bei Computerproblemen mir eigentlich erst klar wurde, als er nicht mehr da war, um sie zu beheben.

Es gibt einige Kollegen, die mir in der letzten Phase der Arbeit besonders geholfen haben, indem sie versucht haben, alle Fehler auszumerzen – danke Christoph, Hanjo, Malte und Sarah. Letztere hat sich besonders bemüht, mir Feinheiten der deutschen Sprache beizubringen mit Bemerkungen wie 'Ziffern von eins bis zwölf werden ausgeschrieben!!'.

Neben den Kulturbanausen im Labor danke ich den Nichtkulturbanausen außerhalb der Forschung für die nötige Ablenkung vom Laboralltag.

Hiermit erkläre ich, gemäß §6 Abs.3, Nr.6 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., daß ich die vorliegende Dissertation selbständig verfaßt und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen, den 05.07.2001

(Beate Fraß)

Hiermit erkläre ich, gemäß §6 Abs.3, Nr.6 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., daß ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und daß diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist.

Essen, den 05.07.2001

(Beate Fraß)

Hiermit erkläre ich, gemäß §6 Abs.3, Nr.6 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., daß ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema 'Regulation des POU Faktors Brn-3a und Analyse seiner Effektorgene' zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Frau Beate Fraß befürworte.

Essen, den 05.07.2001

(Prof. Dr. Tarik Möröy)